

**Die katabolen Eigenschaften endostaler  
Knochenoberflächenzellen -  
Immunfluoreszenzuntersuchungen der Metalloproteinasen  
und ihrer Inhibitoren**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität

Vorgelegt von Melanie Kreisel  
aus Gießen

Gießen 2009

Aus dem Institut für Pathologie  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen  
Ehemaliger Leiter: Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. A. Schulz  
Gutachter: Prof. Dr. E. Roeb

Tag der Disputation: 18.12.2009

## **Inhalt**

<b><u>1. Einleitung</u></b>	<b>Seite</b>
1.1 Auf- und Abbau des Knochens mit zunehmendem Lebensalter	6
1.2 Physiologischer Knochenumbau: „remodelling“	8
1.3 Pathologischer Knochenverlust: Osteoporose	10
1.4 Epidemiologie und klinisches Erscheinungsbild der Osteoporose	14
<b><u>2. Zellbiologie des Skelettsystems</u></b>	
2.1 Osteoblasten	16
2.2. Osteocyten	17
2.3 Lining cells	18
2.4 Osteoklasten	19
<b><u>3. Biochemische Vorgänge im Skelettsystem</u></b>	
3.1 Knochenformation: Bestandteile, Matrixsynthese und Mineralisation	20
3.2 Knochenresorption: Demineralisation, Matrixabbau (Degradation)	23
3.3 Funktionsweise der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und ihrer Inhibitoren (TIMP)	24
<b><u>4. Fragestellung</u></b>	25

## **5. Material und Methoden**

5.1	Vorbereitende Arbeiten	26
5.1.1	Immunfluoreszenz an Zellkulturen	26
5.1.2	Austesten der MMP- und TIMP-Antikörper	29
5.1.3	Austesten der Antikörper für die morphometrischen Berechnungen	32
5.2	Knochenproben/ Einteilung in Patientengruppen	33
5.3	Antikörper	34
5.4	Immunhistochemische Methoden	37
5.4.1	Methode der Immunfluoreszenz	37
5.4.2	Methode der Immunhistochemie mit enzymatischer Detektion	38
5.5	Knochenhistomorphometrie	40

## **6. Ergebnisse**

6.1	Ergebnisse der Morphometrie	42
6.2	Darstellung der Ergebnisse der Morphometrie	49
6.2.1	Darstellung der Osteoklasten mit CD 68	49
6.2.2	Darstellung der Osteoblasten mit VS38c	50
6.3	Ergebnisse der Immunfluoreszenz	51
6.4	Darstellung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz	54
6.4.1	MMP 2 in der Immunfluoreszenz	54
6.4.2	MMP 13 in der Immunfluoreszenz	55
6.4.3	MMP 14 in der Immunfluoreszenz	56
6.4.4	TIMP 1 in der Immunfluoreszenz	57
6.4.5	TIMP 2 in der Immunfluoreszenz	58
6.4.6	TIMP 3 in der Immunfluoreszenz	59
6.4.7	TIMP 4 in der Immunfluoreszenz	60
6.4.8	Keratin in der Immunfluoreszenz	61



## **7. Diskussion**

7.1 Morphometrie	62
7.2 Immunfluoreszenz	65
7.3 MMPs und TIMPs in Lining cells	66
7.4 Bedeutung für die Entstehung einer Osteoporose	70

## **8. Zusammenfassung**

72

## **9. Summary**

74

## **10. Literatur**

75

## **11. Anhang**

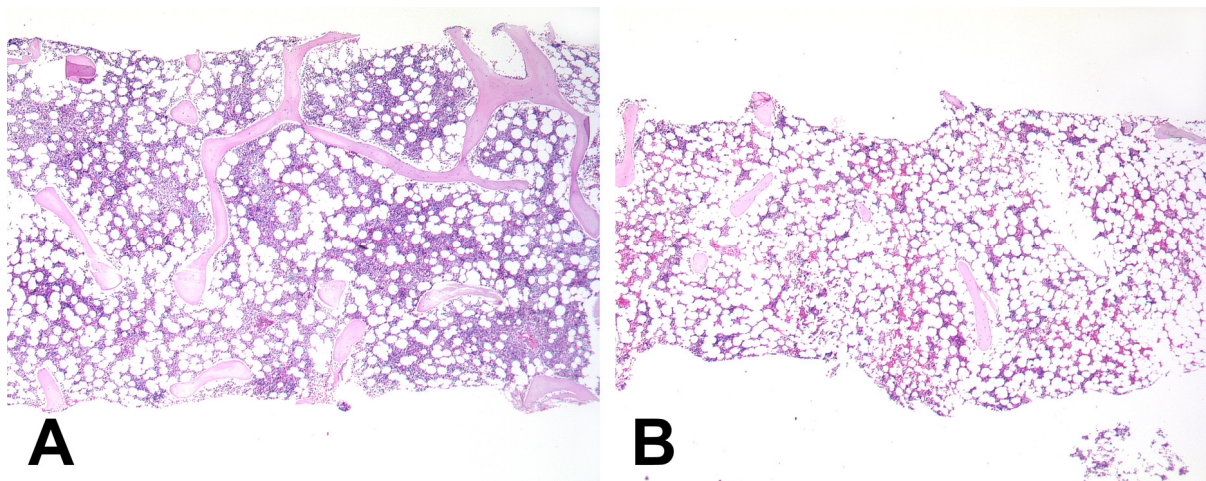
93

11.1 Abkürzungsverzeichnis	93
11.2 Materialliste	94
11.3 Eigene Publikationsliste	95
11.4 Erklärung	96
11.5 Danksagung	97

## 1. Einleitung

### 1.1. Auf- und Abbau des Knochens mit zunehmendem Lebensalter

Der menschliche Knochen befindet sich in ständigem Auf- und Abbau durch Osteoblasten und Osteoklasten, welche sich in der Regel die Waage halten. Die höchste Knochendichte („peak bone mass“), mit leichten Schwankungen in Bezug auf einzelne Knochen und zwischen den Geschlechtern, wird gegen Ende der zweiten, Beginn der dritten Lebensdekade gemessen. Danach beginnt ein langsamer und physiologischer Knochenverlust. Dies zeigt sich unter anderem in der Knochenspongiosa. Im jüngeren Organismus sind die einzelnen Trabekel der Spongiosa miteinander verbunden und vorwiegend plattenförmig, sie zeigen sich im Schnittpräparat als vernetzte Balken (Abb. 1 a). Bei älteren Menschen nimmt die Vernetzung der nun eher stabförmigen Trabekel ab und einzelne Knochenbälkchen sind als runde bis ovale Anschnitte im Schnittpräparat zu erkennen (Abb. 1 b).



**Abb. 1** Spongioser Knochen von jüngeren Menschen im Vergleich zu älteren Menschen.

**a** Knochenspongiosa eines jüngeren Menschen (x 25). **b** Knochenspongiosa eines älteren Menschen (x 25). (alle HE).

Das Verhältnis von Kortikalis zu Spongiosa ist deutlich in Richtung Kortikalis verschoben. Etwa 80% der Knochenmasse entfallen auf die Kortikalis, während nur 20% des Knochens spongiöser Natur sind. Bei den langen Röhrenknochen ist dies noch ein wenig ausgeprägter mit einem Verhältnis von 90% Kortikalis zu 10% Spongiosa.

Während der Kindheit und Jugend verändert sich das Skelett hauptsächlich durch das Längenwachstum im Bereich der Epiphysen. Dieses Längenwachstum wird mit dem Ende der Pubertät abgeschlossen. Bis zu diesem Zeitpunkt ist der Knochen noch relativ elastisch, mit dem Ende der Pubertät nimmt die Festigkeit des Knochengewebes dann zu. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die mit der Pubertät beginnende Ausschüttung von Sexualhormonen, vor allem dem antiresorptiv wirkenden Östrogen (Lindsay et al.; 2006).

Die Knochenneubildung („modelling“) und der Knochenumbau („remodelling“) sind in Kindheit und Jugend ausgeprägt, während im Erwachsenenalter ausschließlich das „remodelling“ stattfindet. Die endostale Umbauoberfläche des Knochens in Form von aktiven Osteoblasten und Osteoklasten nimmt im höheren Alter auf etwa 10% - 20% ab, während reziprok dazu die als inaktiv betrachteten endostalen Knochenoberflächen, die von den so genannten „lining cells“ bedeckt werden, auf 80% - 90% zunehmen (Nelson et al.; 2006).

Knochenentwicklung, Wachstum und Festigkeit sind durch äußere Umstände beeinflussbar. So ist Knochen, der häufiger mechanischer Belastung ausgesetzt ist, besser mineralisiert und somit fester (Turner et al.; 2002). Weitere Einflussfaktoren sind beispielsweise Calcium-Aufnahme mit der Nahrung und Hormone (Dawson-Hughes et al.; 2006). Unter den Sexualhormonen spielt das Östrogen eine besondere Rolle. Die Abnahme dieses Hormons in der Menopause führt zu einem kontinuierlichen Knochenverlust, der bei entsprechender Verminderung der Gesamtknochenmasse (radiologisch: der Knochendichte) als postmenopausale Osteoporose bezeichnet wird (Lindsay et al.; 2006).

## **1.2 Physiologischer Knochenumbau: „remodelling“**

Mit Abschluss des Längenwachstums verliert der Knochen seine Fähigkeit zum An- und Abbau nicht. Er befindet sich weiterhin in einem stetigen Umbauprozess, dem „remodelling“. Dies ist wichtig, damit sich der Knochen aktuellen Anforderungen anpassen kann. Älterer Knochen wird abgebaut und durch Neuen im gleichen Umfang ersetzt.

Osteoblasten, Osteoklasten und lining cells wirken kollektiv beim Knochenumbau zusammen und werden deshalb als „Basic multicellular unit“ (BMU) zusammengefasst (Frost et al.; 1989). Bei Bedarf formieren sich diese Zellen zu einer BMU, welche sich nach abgeschlossenem „remodelling“ wieder auflöst. Im Körper sind Millionen dieser BMUs ständig in unterschiedlichen Stadien ihres Zyklus aktiv und garantieren damit einen steten Knochenumbau und eine Erneuerung des gesamten Skelettes innerhalb von vier bis fünf Jahren. Die Lebenszeit einer einzelnen BMU ist nicht vollständig geklärt, vermutet werden zwei bis acht Monate, wobei die Lebensdauer der einzelnen Zellen einer BMU kürzer ist.

Starter für die Formation einer BMU können die unterschiedlichsten Faktoren sein, wie beispielsweise mechanische Belastung, kleinste Knochenverletzungen („microcracks“), Hormone, Cytokine und Wachstumsfaktoren (Ott et al.; 1996).

Das „remodelling“ durch eine BMU läuft in vier unterschiedlichen Phasen ab:

### 1. Aktivierungsphase:

Zunächst formieren sich die flachen lining cells zu runden, aktiven Zellen, welche Collagenasen sezernieren und mittels Cytokinen Osteoklasten rekrutieren.

### 2. Osteoklastäre Resorption:

In dieser Phase „entmineralisieren“ Osteoklasten den Knochen zunächst, indem sie mit Hilfe einer Protonenpumpe ein saures Milieu auf der Knochenoberfläche schaffen, um dann mittels lysosomaler Enzyme (Cathepsin K und Collagenasen) das freigelegte Kollagen I des Knochens abzubauen. Diese Phase dauert in etwa 30 Tage.

### 3. Formation:

Die von den Osteoklasten geschaffene saure Umgebung führt chemotaktisch zur Einwanderung von Osteoblasten, welche Osteoid bilden und somit die durch die Osteoklasten entstandenen Mulden im Knochen wieder auffüllen. Die osteoblastäre Knochenneubildung dauert etwa 60 – 90 Tage.

### 4. Mineralisierung:

In der letzten Phase wird der neue Knochen mineralisiert.

In dieser Art und Weise „wandert“ eine BMU mit einer Geschwindigkeit von etwa 10 µm/d an der endostalen Knochenoberfläche entlang, und hinterlässt neu formierten Knochen. (Ott et al.; 1996)

### **1.3 Pathologischer Knochenverlust: Osteoporose**

Die Knochenmasse und die Knochendichte haben um die dritte Lebensdekade ihren Höhepunkt erreicht („peak bone mass“), danach beginnt ein langsamer und steter Abbau des Knochens. Überschreitet der Knochenverlust diese physiologische Abnahme, indem das Gleichgewicht zwischen An- und Abbau zu Ungunsten des Anbaus verschoben wird, kann eine Osteoporose entstehen. Man teilt die Osteoporose in Bezug auf An- und Abbau ein, in „low-turnover“- und „high-turnover“-Osteoporose. Bei der „high-turnover“-Osteoporose, welche am häufigsten in den ersten zehn Jahren postmenopausal zu finden ist, schreitet der Knochenverlust schneller voran und ist durch einen erhöhten Knochenabbau bei normalem Anbau bedingt. Bei der „low-turnover“-Osteoporose ist hingegen der Abbau des Knochens normal, während der Anbau vermindert ist. Man findet diese langsam voranschreitende Form erst nach über zehn Jahren nach der Menopause. Eine Einteilung der Osteoporosen basiert auf ätiologischen Vorstellungen. Zu den primären Formen der Osteoporose, welche etwa 95% aller Osteoporosen ausmachen, werden die postmenopausale Osteoporose und die Altersosteoporose (=senile Involutionsosteoporose) gezählt. Ursächlich für die postmenopausale Osteoporose ist eine verminderte Ausschüttung von Östrogen nach der Menopause, während die Ursache für die senile Involutionsosteoporose weitestgehend unbekannt ist (Eastell et al.; 2006).

Bei sekundären Formen ist die Osteoporose eine Art Nebeneffekt neben einer anderen Grunderkrankung oder einer anderen bekannten Ursache, welche die Osteoporose bedingt. Insgesamt machen die sekundären Osteoporosen nur etwa 5% aller Osteoporosen aus.

Ursächlich sind hier beispielsweise endokrine Störungen, wie ein Hypercortisolismus beim M. Cushing, ein Hyperparathyreoidismus, ein Hyperthyreoidismus oder ein Diabetes mellitus als Grunderkrankung. Auch durch eine Langzeittherapie mit Glucocorticoiden kann eine (iatrogene) Osteoporose bedingt sein. Weitere Ursachen für sekundäre Osteoporosen sind längere Immobilisationen und mangelnde Aufnahme von Calcium und Vitamin D<sub>3</sub>, beispielsweise durch Mangelernährung, Malabsorption, Kachexie oder Anorexie (Rosen et al.; 2006).

Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl von Faktoren, welche nicht im eigentlichen Sinne ursächlich sind für die Entstehung einer Osteoporose, aber protektiven bzw.

fördernden Einfluss nehmen können. Zu den protektiven Faktoren zählt eine ausreichende körperliche Betätigung und eine calciumreiche Ernährung. Einen fördernden Einfluss auf die Entstehung einer Osteoporose haben ein übermäßiger Alkoholgenuss, Rauchen und bestimmte Medikamente. Hier sind neben den bereits erwähnten Glucocorticoiden beispielsweise bestimmte Antazida zu nennen. Aluminiumhaltige Antazida beispielsweise stören den Calciumhaushalt und können so eine Osteoporose fördern (Cummings et al.; 1985).

Der Knochenverlust betrifft bei der postmenopausalen Osteoporose vorwiegend die Beckenknochen und die Wirbelsäule, während bei der Altersosteoporose das gesamte Skelett, einschließlich der Extremitäten und des Schädels betroffen ist. Bei der postmenopausalen Osteoporose kommt es in den ersten Jahren nach der Menopause zu einem Knochenverlust von etwa 3-10% (!) pro Jahr. In den weiteren Jahren handelt es sich dann „nur“ noch um einen Verlust von etwa 1% pro Jahr (Cummings et al.; 1985).

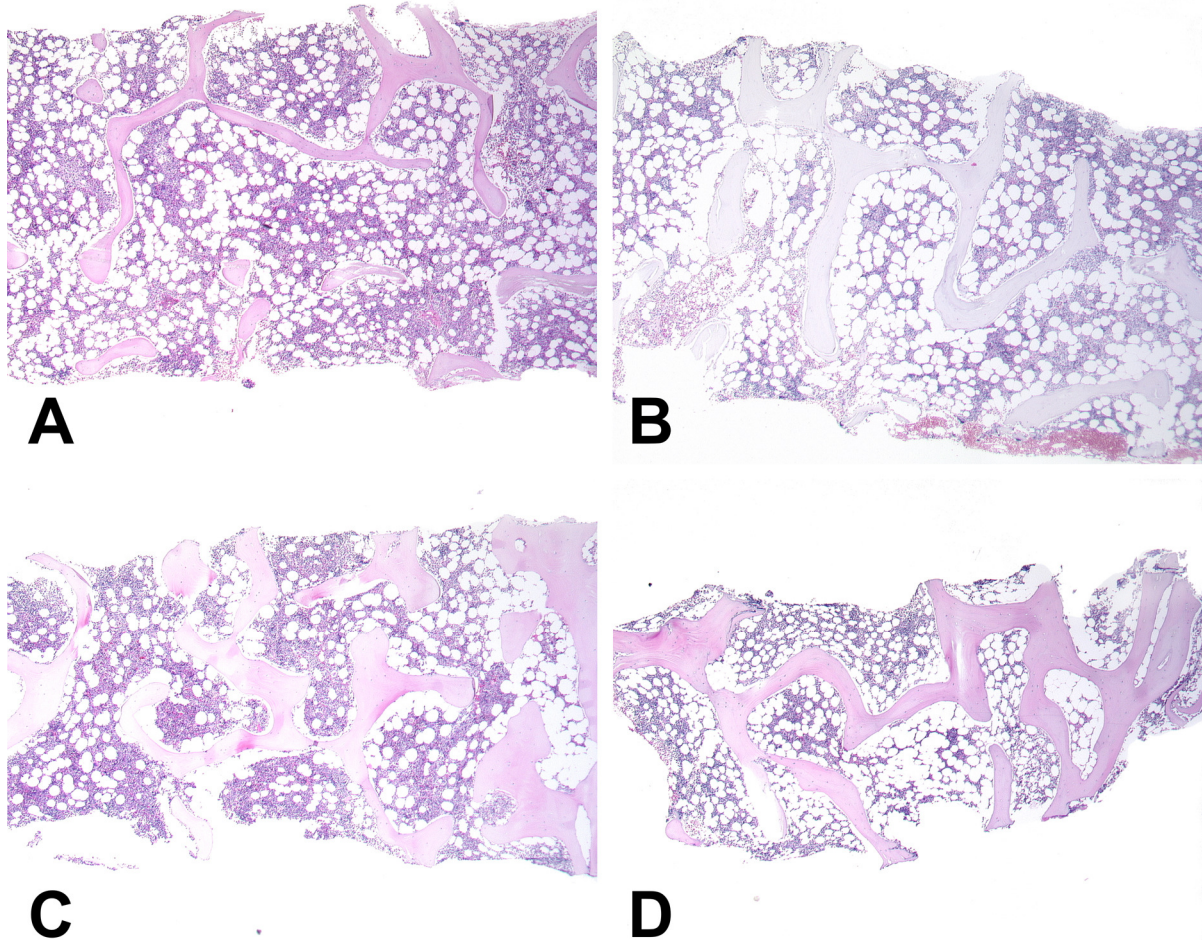
Osteoporose begünstigt Frakturen. Es handelt sich hierbei um sogenannte pathologische Frakturen (= Spontanfrakturen), das heißt Frakturen die ohne adäquates Trauma entstehen. Bevorzugte Orte für solche Frakturen sind vor allem die Wirbelsäule, die Hüfte, der Oberschenkelhals und der distale Unterarm. Hier ist die Radiusfraktur vom Typ Colles am häufigsten. Die bei der Osteoporose häufig vorkommenden Frakturen der Hüfte sind oftmals assoziiert mit nachfolgender Pflegebedürftigkeit, höheren Kosten und, vor allen Dingen bei älteren Patienten, mit einer höheren Zahl an Todesfällen nach einer Hüftfraktur (Harvey et al.; 2006).

Bezogen auf die Histologie des Knochens ist besonders an der Spongiosa die Abnahme der Knochenmasse zu erkennen, da die Spongiosa im Vergleich zur Kortikalis eine wesentlich größere Oberfläche bietet an welcher der Umbau stattfinden kann. Die Zahl der BMUs kann vermehrt oder vermindert sein. Das ist nicht relevant für die Entstehung der Osteoporose, da eine BMU den von ihr abgebauten Knochen im Normalfall auch wieder aufbaut. Vielmehr muss ein Ungleichgewicht bestehen zwischen An- und Abbau.

Im Normalfall besteht ein Gleichgewicht zwischen osteoklastärem Knochenabbau und osteoblastärem Knochenanbau. Diese beiden Vorgänge sind aneinander gekoppelt und wirken im Zusammenspiel. Dies nennt man „coupling“.

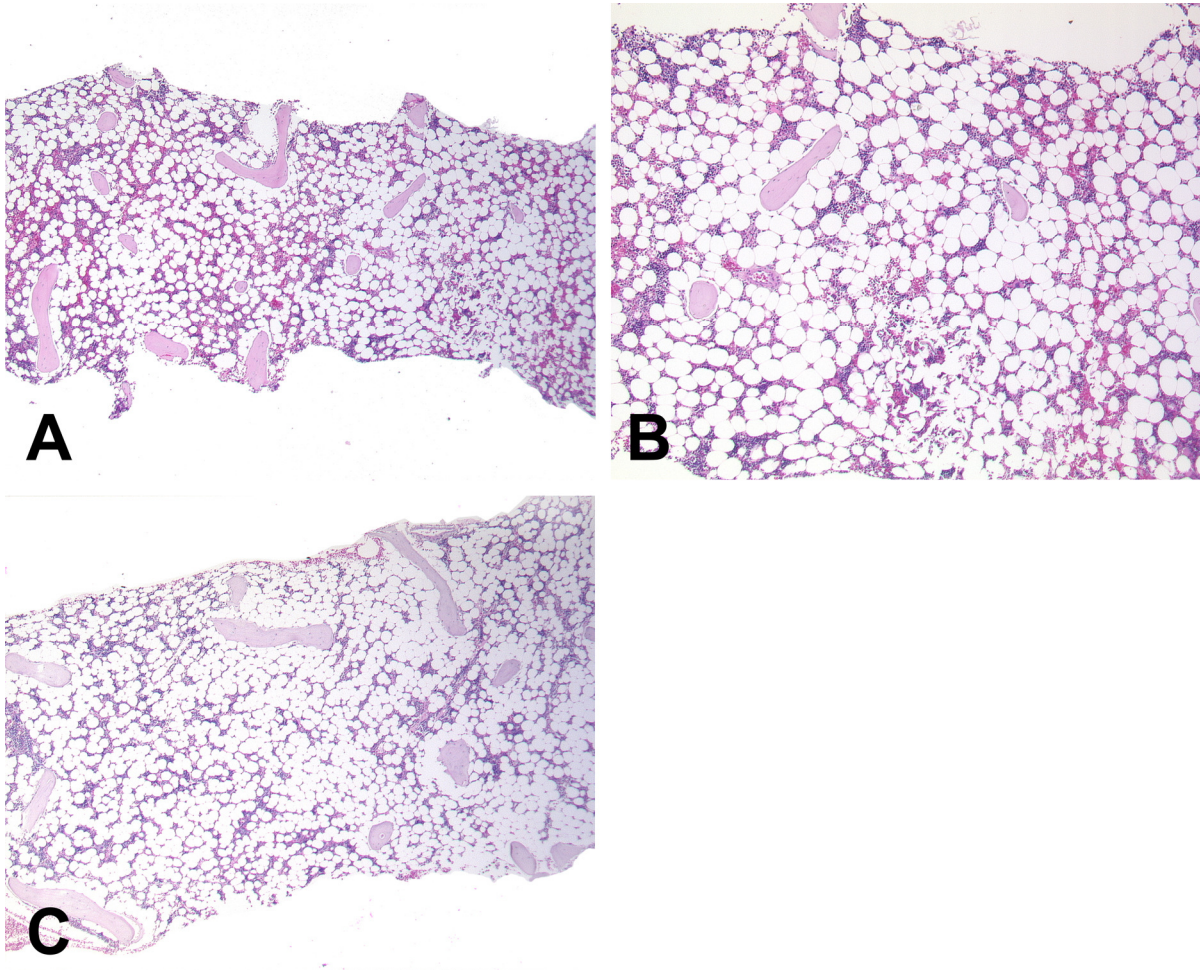
Durch Störungen in diesem Gleichgewicht, dem „uncoupling“, kann es zu einem übermäßigen Verlust der Knochenmasse kommen. Die Trabekelstruktur und -

vernetzung nimmt ab, die Knochenbälkchen werden dünner, womit die Bruchfestigkeit des Knochens abnimmt und das Frakturrisiko steigt (Rodan et al.; 1996).



**Abb. 2 a – d** Normaler, gesunder Knochen mit untereinander vernetzten Spongiosabalken. **a** x 50; **b - d** x 25; (alle HE).





**Abb. 3 a – c** Knochen von Patienten mit manifester Osteoporose. Die Trabekel sind kaum noch miteinander vernetzte und zeigen eher rundliche Anschnitte. Insgesamt zeigt sich eine starke Abnahme der Knochenmasse. **a** x 25; **b** x 50; **c** x 25 (alle HE).

## **1.4 Epidemiologie und klinisches Erscheinungsbild der Osteoporose**

Etwa 7,8 Millionen Menschen in Deutschland leiden unter Osteoporose, wovon 6,5 Millionen Frauen sind. Es handelt sich hier also nicht um ein seltenes Krankheitsbild, und doch ist Osteoporose hierzulande unterdiagnostiziert und unterbehandelt. Nur 21,7% der Osteoporosepatienten werden ausreichend medikamentös therapiert. Die 1-Jahres Mortalitätsrate liegt bei 10-20%. Es kommt zu einem Kostenaufwand von 5,4 Milliarden € durch die Folgen der Osteoporose (Haeusler et al.; 2007).

Man kann davon ausgehen, dass bei Menschen über 50 Jahren, bei etwa 22,5% der Männer und 23,1% der Frauen eine Osteoporose morphologisch nachweisbar ist (Caldwell et al.; 1962). Dies bedeutet allerdings nicht, dass sich diese Osteoporose auch klinisch bemerkbar macht.

Epidemiologisch betrachtet, betrifft die Osteoporose mehr Frauen als Männer. Am häufigsten ist die Osteoporose bei älteren weißen Frauen. Bei Menschen mit dunkler Hautfarbe konnte im Vergleich mit hellhäutigen Menschen eine höhere Knochendichte, eine dickere Kortikalis und eine insgesamt höhere „bone mass“ festgestellt werden. Dies sind die Gründe dafür, dass in der schwarzen Bevölkerung Osteoporose eine seltene Erkrankung ist. Im Vorkommen der Osteoporose sind auch geographische Unterschiede festzustellen. So gibt es in den USA, Neuseeland und Europa vermehrt Patienten mit Osteoporose, während in Südafrika die Zahl der Osteoporosepatienten sehr gering ist. In den Ländern mit hoher Anzahl von Osteoporosepatienten ist der Unterschied zwischen den Geschlechtern deutlicher. Das heißt, es sind wesentlich mehr Frauen betroffen als Männer. In den Ländern mit geringer Osteoporoserate ist das Geschlechterverhältnis dagegen relativ ausgeglichen (Cummings et al.; 1985).

Gefährlichste Folge der Osteoporose sind die mit ihr assoziierten Frakturen, welche durch den stetig fortschreitenden Knochenverlust und die damit verbundene Zunahme der Knochenbrüchigkeit einhergehen. Beispielsweise kommt es bei einer Frau mit Osteoporose über die gesamte Lebensspanne zu einem Verlust von 42% des Knochens der Wirbelkörper und 58% des Femurknochens. Aber nicht der Verlust der Knochenmasse alleine begünstigt die Frakturen. Da Osteoporose eine Erkrankung ist, welche vermehrt ältere Patienten betrifft (senile Osteoporose) kommt zum Verlust der Knochendichte die Tatsache, dass die Sturzneigung sich im Alter erhöht. Die Fähigkeit Instabilitäten auszugleichen nimmt ab, ebenso die

Muskelaktivität. All dies zusammen führt dazu, dass mit dem Älterwerden der Bevölkerung die Frakturrate ansteigt (Rosen et al.; 2006).

Beurteilen lässt sich die Osteoporose am besten über eine quantitative Computertomographie (QCT). Hierbei wird die Knochendichte (bone mineral density = BMD) eines gesunden 30jährigen Menschen als Referenzwert angenommen und mit dem untersuchten Wert verglichen. Eine Standardabweichung (SD= standard deviation) oder auch T-Score von bis zu -1 ist noch als gesund anzusehen. Bei einem T-Score von -1 bis -2,5 handelt es sich um eine Osteopenie und ein T-Score von < -2,5 diagnostiziert eine manifeste Osteoporose (Greenspan et al.; 2006).

Erst im späteren Verlauf der Osteoporose wird diese klinisch manifest. Sie kann sich zunächst bemerkbar machen durch Schmerzen, vor allem im Rücken. Die häufig auftretenden Sinterungsfrakturen der Wirbelkörper, welche nicht als plötzliches akutes Ereignis auftreten, sondern langsam fortschreiten, führen zu Rundrücken, Gibbusbildung und einer Abnahme der Körpergröße.

Die gefährlichsten Folgen der Osteoporose sind aber, wie bereits erwähnt, die pathologischen Frakturen, welche oft multipel auftreten.

Um dem vorzubeugen, gilt es die Risikofaktoren zu begrenzen, sofern diese beeinflussbar sind. Nicht-beeinflussbare Risikofaktoren sind Alter und Geschlecht; hier kann nichts verändert werden. Beeinflussbar sind allerdings Faktoren, wie ein zu niedriger Östrogenspiegel (durch eine späte Menarche und eine frühe Menopause), Inaktivität, calciumarme Ernährung, Rauchen und Alkohol. Hier kann durch entsprechende Lebensänderung ein positiver Einfluss genommen werden auf die Entwicklung der Osteoporose. Auch eine medikamentöse Therapie mit Bisphosphonaten, welche die Osteoklastenaktivität hemmen, wirkt sich positiv aus. Dies alles sind aber leider nur symptomatische Behandlungsversuche, eine Therapie der Ursache ist bisher nicht möglich. Deshalb bedarf es ausführlicher Ursachenforschung dieser Erkrankung, um diese in Zukunft noch besser therapieren zu können.

## 2. Zellbiologie des Skelettsystems

### 2.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind kubische Zellen mit großem Zellkern, großem Golgi-Apparat, viel rauem endoplasmatischen Retikulum (rER), und sie sind reich an alkalischer Phosphatase. Dies alles sind Hinweise für die hohe Syntheseleistung dieser den Knochen aufbauenden Zellen. Vorläufer der Osteoblasten sind Osteoprogenitorzellen, welche auch die Ursprungszelle der Osteozyten und der lining cells darstellen. Diese drei Zelltypen werden als „osteoblast lineage“ zusammengefasst (Aubin et al.; 1996).

⇔ „lining cell“

Osteoprogenitorzellen ⇒ Pre-Osteoblast ⇒ Osteoblast

⇒ Osteozyt

Bestimmte Stoffe, wie beispielsweise Osteoblast-stimulating-factor-1 wirken chemotaktisch auf Osteoprogenitorzellen und induzieren so die Matrixsynthese. Osteoblasten bilden mit Kollagen I und den nicht-kollagenen Matrixproteinen (NCP) das zunächst noch unmineralisierte organische Grundgerüst des Knochens, das Osteoid. Die einzelnen Osteoblasten sind über tight junctions miteinander und mit lining cells und Osteozyten vernetzt und so in der Lage untereinander zu „kommunizieren“ und auf äußere Einflüsse als Netzwerk zu reagieren (Turner et al.; 2002).

## **2.2 Osteozyten**

Die letzte Stufe der Zellentwicklung der „osteoblast lineage“ stellen die Osteozyten dar. Nach Abschluss der Matrixsynthese werden die aktiven Osteoblasten in ihrer eigenen Matrix „eingemauert“ und ab diesem Zeitpunkt als Osteozyten bezeichnet. Osteozyten besitzen wesentlich weniger cytoplasmatische Organellen als Osteoblasten, da ihre metabolische Funktion im Vergleich zu den knochenaufbauenden Zellen geringer ist. Dennoch haben sie, in geringem Umfang, weiterhin die Fähigkeit Knochenmatrix zu bilden und auch abzubauen und so am „remodelling“ teilzunehmen. Osteozyten haben lange Zellausläufer in Knochenkanälchen, welche sie untereinander und mit Osteoblasten und mit lining cells verbinden. Diese Zellausläufer ermöglichen die „Kommunikation“ innerhalb dieses Netzwerkes und stellen die Erhaltung der Osteozyten selbst sicher. Aufgabe der Osteozyten ist die Aufrechterhaltung des Knochens, indem sie auf äußere Einflüsse, wie beispielsweise mechanische Belastung (Ajubi et al. 1996) und Schwankungen im Calciumhaushalt (Kamioka et al. 1995), gemeinsam mit Osteoblasten und lining cells reagieren und bei Bedarf ihre metabolische Funktion wieder erhöhen können.

Die Lebenszeit der Osteozyten ist extrem lang und kann Jahrzehnte überdauern. Nach Apoptose eines Osteozyten, beispielsweise durch Abriss der Zellausläufer, durch Umbau des Knochens oder kleinste Verletzungen, wodurch die Ernährung des Osteozyten unterbrochen ist, bleiben im Knochen leere Lakunen, die später mineralisieren, was als Mikropetrose bezeichnet wird (Holmbeck et al.; 2005).

## **2.3 Lining cells**

Bei den lining cells handelt es sich um flache, etwa 80-90% der endostalen Knochenoberfläche bedeckende Zellen, welche eine Deckzellschicht zwischen Knochenmark und Knochen bilden. Die auch als Hemiosteozyten bezeichneten Zellen entwickeln sich aus Osteoprogenitorzellen über Pre-Osteoblasten und Osteoblasten, weshalb man sie lange Zeit auch als „ruhende Osteoblasten“ bezeichnete. Die flachen, maximal 0,1 µm dicken Zellen sind untereinander und mit den anderen Zellen der „osteoblast lineage“ über gap junctions vernetzt. Sie bilden ein gemeinsames Netzwerk, in welchem die lining cells unter anderem als „Mechanorezeptoren“ fungieren. Das bedeutet, dass sie Belastungen registrieren und mechanische Einflüsse auf den Knochen wahrnehmen können und dann in der Lage sind, gemeinsam mit Osteoblasten und Osteozyten zu reagieren (Turner et al.; 2002). Im Zytoplasma befinden sich neben dem abgeflachten Zellkern vereinzelte Organellen, unter anderem Mitochondrien, freie Ribosomen, raues endoplasmatisches Retikulum (rER) und Golgi Apparat, was dafür spricht, dass lining cells nicht ausschließlich ruhende Zellen darstellen, sondern auch zur Synthese befähigt sind.

Des Weiteren haben lining cells die Fähigkeit zum Abbau von Knochenkollagen. Es hat sich gezeigt, dass Osteoklasten, nachdem sie Knochenmatrix abgebaut haben, kleinste Kollagenreste in den „Howship-Lakunen“ zurücklassen. Die „Howship-Lakunen“ wurden dann von lining cells besiedelt, welche die Kollagenreste entfernten und eine dünne Osteoidschicht hinterlassen (Everts et al 2002).

Lining cells sind also durchaus nicht die ruhenden, inaktiven Zellen für die man sie lange Zeit gehalten hat. Neben ihrer Aufgabe als Barriere zwischen endostaler Knochenoberfläche und Markraum spielen sie eine Rolle im „bone remodelling“. Sie können Knochenmatrix synthetisieren und auch abbauen. Bei diesen Abbauprozessen spielen die von uns untersuchten Matrix-Metalloproteinasen eine entscheidende Rolle.

## **2.4 Osteoklasten**

Die vielkernigen Osteoklasten gehören zur Familie der Monocyten und Makrophagen und sind die Knochen abbauenden Zellen. Eine Regulation der Osteoklastenentwicklung und –aktivierung findet über unterschiedliche Cytokine, wie RANKL oder Faktoren wie M-CSF (= makrophage colony stimulating factor) statt. Osteoklasten sind über Intergrine mit der Knochenmatrix verbunden. Dieser Zell-Matrix-Kontakt dient der Haftung und der Ausbildung einer Abschlusszone, der „sealing-zone“, zwischen dem Knochenabschnitt der unter dem Osteoklasten liegt, und dem umliegenden Gewebe. An der Stelle an der Osteoklasten dem Knochen aufliegen, ist die Zellwand mehrfach gefaltet, die so genannte „ruffled boarder“, an deren Rand die oben genannte „sealing-zone“ anschließt. Über die Membran der „ruffled boarder“ gibt der Osteoklast mittels Protonenpumpen ( $H^+$ -ATPase)  $H^+$  in den Spalt zwischen Knochen und Osteoklast ab und bildet so ein saures Milieu. Diese saure Umgebung mit einem pH von etwa 4,5 ist nötig, um den Knochen zu entmineralisieren und die organischen Knochenmatrixbestandteile freizulegen. Die freiliegende Matrix wird dann mit Hilfe von lysosomalen Enzymen des Osteoklasten (Cathepsin K, Matrix-Metalloproteinasen), welche ebenfalls über die „ruffled boarder“ ausgeschüttet werden, abgebaut (Heersche et al.; 1978; Ross et al.; 2006).

### **3. Biochemische Vorgänge im Skelettsystem**

#### **3.1 Knochenformation → Bestandteile, Matrixsynthese, Mineralisation**

Der menschliche Knochen und das Skelettsystem haben vielfältige Aufgaben. Unter anderem den Schutz von inneren Organen, beispielsweise im Thorax und Schädelbereich. Das Skelett gibt dem Körper Halt und ist die Grundlage dafür, dass geregelte Bewegungen ausgeführt werden können, außerdem ist die Rolle des Knochens als Mineralienspeicher unverzichtbar.

Knochen besteht aus einer oberflächlichen kompakten Schicht, der Kompakta, welche etwa 80% der Knochenmasse ausmacht, und einer im Inneren des Knochens schwammartig angeordneten Struktur von Knochenbälkchen, der Spongiosa, welche 20% der Knochenmasse ausmacht, wobei das Verhältnis von Kompakta zu Spongiosa je nach Knochen variieren kann. Die Grundstruktur des Knochens ist in spongiösem Knochen und Kompakta gleich. Einzelne Knochenlamellen bilden die röhrenförmigen Osteone. In der Kortikalis sind im Inneren dieser Osteone kleinste Kanälchen, die sogenannten Havers` Kanäle welche Blutgefäße führen.

Außen ist der Knochen bedeckt von einer „Knochenhaut“, dem Periost, welches eine osteogene Potenz besitzt. Die Knochenbinnenräume, welche auch Raum sind für das Knochenmark, sind ebenfalls von einer dünnen Schicht bedeckt. Diese endostale Oberfläche wird zum größten Teil von lining cells gebildet (Dempster; 2006).

Die Bestandteile des Knochens sind zu 35% organischer Natur und zu 65% Anorganisch.

Organischer Bestandteil des Knochens ist zu 95% Kollagen I, welches aus einer Triple-Helix aus zwei  $\alpha_1$ -Ketten und einer  $\alpha_2$ -Ketten besteht.

Zu den nicht-kollagenen Proteinen (NCP), welche 5% der organischen Bestandteile des Knochens ausmachen, zählt man Matrixproteine, welche in vier Untergruppen eingeteilt werden:

1. Proteoglykane haben saure Polysaccharidseitenketten, womit sie an Kollagen binden. Zu ihnen zählt man Decorin und Biglycan, sie regulieren Osteoblasten



und die Matrix-Mineralisation.

2. Glykosylierte Proteine wie die alkalische Phosphatase bilden die zweite Untergruppe der NCP. Alkalische Phosphatase ist ein Calcium-Carrier und somit wichtig für die Mineralisation des Knochens. Zu den glykosylierten Proteinen gehört auch Osteonectin, welches eine Rolle spielt bei der Matrixmineralisierung (Regulierung der Verknüpfung von Kollagen und Hydroxylapatit) und der Kollagen-Fibrogenese. Außerdem reguliert es, ähnlich wie Decorin und Biglycan, die Osteoblastenfunktion.
3. Glykosylierte Proteine zur Zelladhäsion, beispielsweise Osteopontin und bone sialoprotein (BSP) sind die dritte Gruppe und haben eine hemmende Wirkung auf den Knochenaufbau, indem sie die Mineralisation hemmen und Osteoklasten fördern.
4. Osteokalzin bildet die vierte Gruppe und ist das am häufigsten vorkommende Protein. Es hat eine Vitamin-K-abhängig fördernde Wirkung auf Osteoklasten. (Robey et al.; 1996)

Die anorganischen Bestandteile des Knochens, bestehen überwiegend aus Calcium und Phosphat in Form von Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ). Sie sind an die organische Matrix, das heißt an das Kollagen und die nicht-kollagenen Knochenproteine gebunden und sorgen für die Festigkeit des Knochens. Das Hydroxylapatit bildet Kristalle mit einem durchschnittlichen Durchmesser von  $40 \times 30 \times 4 \text{ nm}$ , welche parallel zu den Kollagenfasern liegen. Im Vergleich zu geologisch vorkommendem Hydroxylapatit sind die Kristalle im menschlichen Körper wesentlich kleiner und dadurch löslich, was extrem wichtig ist für die Funktion des Knochens als Mineralienspeicher, welcher bei Bedarf Mineralien freisetzen kann. Die Mineralisierung des Knochens wird von nicht-kollagenen-Matrixproteinen reguliert (Robey et al.; 2006).

Die Entstehung des Knochens ist auf zwei unterschiedliche Arten möglich. Die direkte Bildung von Knochengewebe aus mesenchymalen Zellen wird als desmale Ossifikation bezeichnet. Bei dieser direkten Knochenbildung entwickeln sich an Ossifikationspunkten Osteoblasten aus den Mesenchymzellen und scheiden Osteoid ab. Osteoid ist noch unverkalkte Matrix, welche im Wesentlichen aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Kollagen I besteht und dann durch Ausfällung

von Calciumphosphat mineralisiert wird. Durch desmale Ossifikation entstehen aber nur wenige Knochen, unter anderem einige Schädelknochen, die Clavikula und das Os ileum. Die hierbei entstandenen Knochen werden als Deckknochen bezeichnet. Fast alle anderen Knochen entstehen durch chondrale Ossifikation. Bei dieser indirekten Knochenbildung entwickelt sich der Knochen aus einem zuvor knorpelig angelegten Gerüst. Man unterscheidet zwischen perichondraler und enchondraler Ossifikation, wobei es sich bei der perichondralen Ossifikation streng genommen eher um eine desmale Ossifikation handelt, da hierbei neuer Knochen direkt als Mantel um das knorpelige Gerüst gebildet wird. Bei der enchondralen Ossifikation wandern knorpelabbauende Zellen (Chondroklasten) in das Knorpelgerüst ein und bauen dieses ab, um Platz zu schaffen für einwandernde Osteoprogenitorzellen, welche sich zu Osteoblasten entwickeln und hier Osteoid abscheiden, das anschließend mineralisiert wird. In den langen Röhrenknochen bleibt zwischen Epi- und Diaphyse ein knorpeliger Abschnitt bis zum Abschluss des Längenwachstums bestehen, die Epiphysenfuge, von welcher das Längenwachstum ausgeht (Olsen; 2006; Dempster; 2006).

### **3.2 Knochenresorption: Demineralisation, Matrixabbau (Degradation)**

Das Knochensystem befindet sich in einem ständigen Auf- und Abbau-Prozess, um sich Wachstum, kleinsten Verletzungen und äußeren Umständen anpassen zu können („remodelling“). Der Abbau des Knochens durch Osteoklasten läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst wird der Knochen demineralisiert, um die organischen Bestandteile des Knochens, also die Kollagenfibrillen freizulegen. Hierzu sezernieren die Osteoklasten mittels Protonenpumpen  $H^+$  an die Knochenoberfläche und produzieren so einen lokalen pH-Wert von etwa 4,5. Die freigelegten Kollagenfibrillen werden dann mittels lysosomaler Enzyme der Osteoklasten (Cathepsin K, MMPs) abgebaut. Für die Abbau-Prozesse des Knochens ist ein enger direkter Kontakt zwischen Osteoklast („ruffled boarder“) und Knochenmatrix nötig, welcher garantiert wird durch die Verankerung des Osteoklasten am Knochen durch Integrine. Durch die Abbauprozesse entstehen Lakunen in der Knochenoberfläche, in welchen die Osteoklasten dann liegen, die sogenannten Howship-Lakunen. Diese Lakunen werden im Verlauf des remodellings wieder durch Osteoblasten mit neuer Knochenmatrix aufgefüllt. Auch lining cells scheinen zum Knochenabbau ihren Beitrag zu leisten. Es ist bekannt dass sie nach den Osteoklasten die Howship-Lakunen besiedeln und „säubern“ (Everts et al.; 2002).

### **3.3 Funktionsweise der MMPs und ihrer Inhibitoren**

Bei den Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) handelt es sich um proteolytische Endopeptidasen (Cystein-Proteinasen) welche sich in drei Untergruppen einteilen lassen: 1. Collagenasen

2. Gelatinasen

3. Stromelysin

Insgesamt sind über 20 unterschiedliche MMPs bekannt. Die meisten dieser MMPs werden in ihrer inaktiven, oder Pro-Form sezerniert, so dass sie über ihre Aktivierung reguliert werden können. Aktivatoren und somit auch Regulatoren für einige MMPs können z.B. Plasmin, Furin oder urokinase-like-plasminogen-activator sein. Aber auch die MMPs untereinander können eine aktivierende Wirkung haben, so gilt z.B. MMP14 (= MT-MMP1) als Aktivator für MMP2 und MMP13. Bei physiologischem pH sind die Matrix-Metalloproteinasen aktiv (Dzwonek et al.; 2004).

Die MMP-Funktion wird reguliert durch unterschiedliche Mechanismen. So wird die Synthese der Metalloproteinasen beispielsweise kontrolliert durch Cytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone. Die Sekretion dieser Enzyme wird unter anderem reguliert durch die Ausschüttung der TIMPs. Diese „tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“ (TIMPs) hemmen die MMPs, indem sie einen 1:1 Enzym-Inhibitor-Komplex mit diesen bilden (nicht-kovalente Bindung) (Dew et al.; 2000).

Bei den TIMPs handelt es sich um Proteine zwischen 21 - 29 kDa mit zwei Domänen, einer C-terminalen Bindungsdomäne und einer N-terminalen Inhibitionsdomäne. Bisher wurden insgesamt vier TIMPs identifiziert.

MMPs und TIMPs spielen bei vielen physiologischen Vorgängen eine Rolle, wie z.B. bei Gewebeumbau und Gefäßeinsprossung der Plazenta, in der Angiogenese und der Wundheilung. Sie sind auch wichtig für ein geregeltes und gerichtetes Wachstum. So konnten sie in Epiphysenfugen von Kindern nachgewiesen werden (Haeusler et al.; 2005). Die proteolytische Eigenschaft der MMPs ist ebenso bei pathologischen Vorgängen von Bedeutung, wie beispielsweise bei der Invasion von Tumorzellen oder bei Arthritis (Dzwonek et al.; 2004).

#### **4. Fragestellung**

Der Knochenverlust im Rahmen einer „low-turnover“-Osteoporose bei zunehmendem Lebensalter ist über Resorption durch Osteoklasten alleine nicht oder nur schwer erklärbar. Mit zunehmendem Lebensalter nimmt die Aktivität des Knochenumbaus („remodelling“), erkennbar an der verminderten Ausdehnung aktiver endostaler Oberflächen, drastisch ab und liegt in der 6. – 7. Lebensdekade nur noch bei etwa 10%. Die übrigen 90% der endostalen Oberfläche sind scheinbar inaktiv. Sie werden von den „bone lining cells“ bedeckt, deren Rolle bisher nicht im Detail bekannt ist. Es wird deshalb die Hypothese zugrunde gelegt, dass die lining cells über ihre möglichen katabolen Eigenschaften einen langsamen, aber stetigen Knochenverlust herbeiführen. Dadurch wäre, neben der bekannten Imbalance zwischen Knochenanbau durch Osteoblasten und Knochenresorption durch Osteoklasten, eine weitere (möglicherweise quantitativ sehr bedeutsame) Erklärung für den Knochenabbau mit zunehmendem Lebensalter gegeben.

Mit der vorliegenden Arbeit wird deshalb untersucht, inwieweit lining cells über katabole Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen ( und deren Inhibitoren ) verfügen, um hieraus Rückschlüsse auf eine Funktion der lining cells beim nicht-osteoklastären Knochenabbau ziehen zu können.

## **5. Material und Methoden**

### **5.1 Vorbereitende Arbeiten**

Um der dieser Arbeit zugrunde liegenden Hypothese nachgehen zu können, mussten zunächst vorbereitende Schritte durchgeführt werden, da die Methode der Immunfluoreszenz an Knochenschnitten mit besonderen technischen Problemen verbunden ist.

#### **5.1.1 Immunfluoreszenzmethode an Zellkulturen**

Um die Immunfluoreszenz-Färbung auszutesten wurden zunächst Zellkulturen eingesetzt. In unserem Fall testeten wir die unterschiedlichen Osteosarkom-Zelllinien ZK58, SAOS und MG63 aus. Damit die Zellkulturen dem Färbeprozess zugeführt werden konnten, mussten unterschiedliche Vorbehandlungen durchgeführt werden. Das größte Problem stellte hierbei das Abschwimmen der Zellen vom Objektträger dar. Unterschiedliche Fixierungsmethoden wurden ausgetestet.

Die Zellkulturen wurden fixiert:

- in einem Gemischen aus Methanol/Aceton in einem Verhältnis 1:1 bei -20°C für 20 Minuten.
- In einem Gemisch aus Ethanol/Eisessig in einem Verhältnis 95:5 bei -20°C für 20 Minuten.
- In Paraformaldehyd 3% in PBS bei 4°C für 10 Minuten.

Die beste Methode für unsere Zwecke war hier die Behandlung mit Ethanol/Eisessig. Nach Fixieren der Zellkulturen wurde die Methode der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Kollagene, d.h. Strukturproteinen, welche sicher im Knochen vorhanden sind getestet. Außerdem wurden Antikörper gegen Nicht-Kollagene-Knochenproteine (Osteocalcin, Osteoprotegerin, Decorin) und Vimentin eingesetzt.

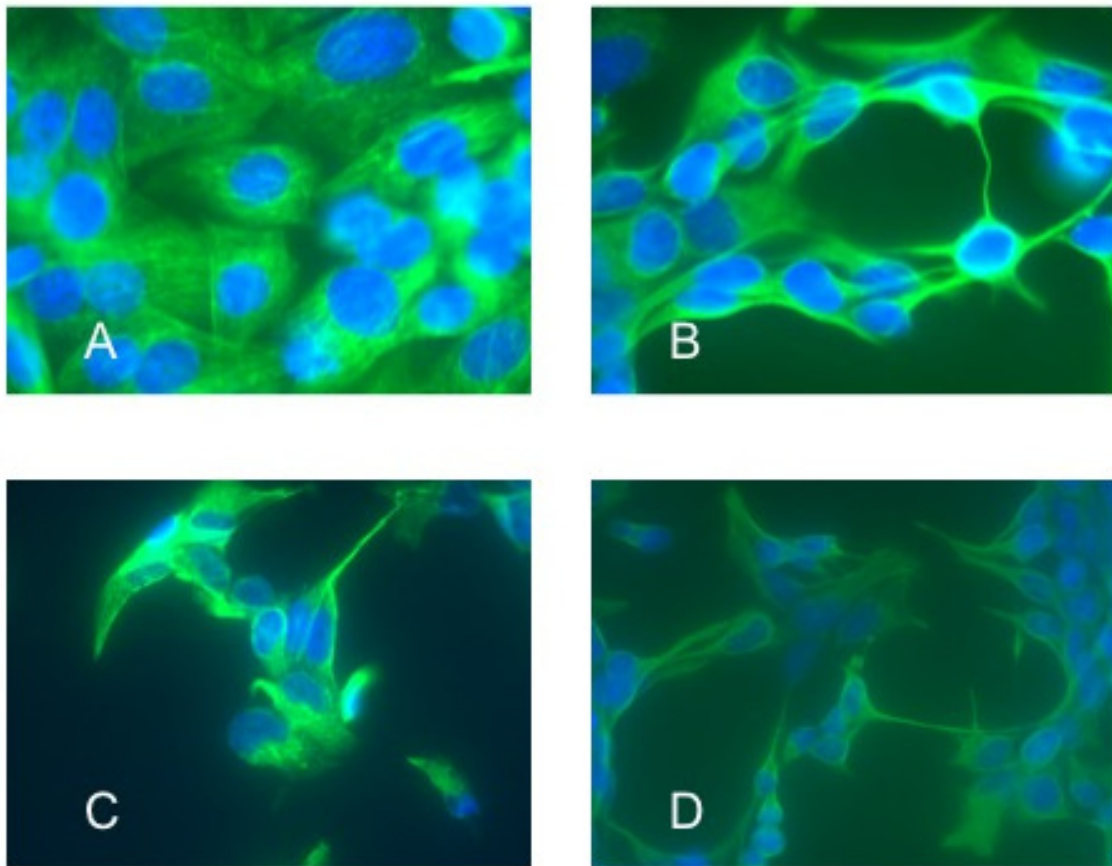
Nach Fixierung der Zellkulturen, wurden die Präparate mit Triton X<sub>100</sub> 0,1% (Fa. Merck) für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) vorbehandelt. Danach erfolgte zum Blocken von unspezifischen Reaktionen eine weitere Vorbehandlung mit 3% BSA in PBS. So vorbereitet konnten die entsprechenden Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen aufgebracht werden:

- Vimentin (V9)                    1:50 (monoklonaler mouse-anti-human AK; Fa. DAKO)
- Collagen 1                        1:10 (polyklonaler rabbit-anti-human AK; Fa. Chemicon)
- Collagen 2                        1:10 (polyklonaler rabbit-anti-human AK; Fa. Chemicon)
- Collagen 3                        1:10 (polyklonaler rabbit-anti-human AK; Fa. Chemicon)
- Osteocalcin \*                    1:100 (monoklonaler mouse-anti-human-AK)
- Osteopontin (=LF7)\* 1:1000 (polyklonaler rabbit-anti-human-AK)
- Decorin (=LF4)\*                1:100 (polyklonaler rabbit-anti-human-AK)

\* Die Antikörper gegen Osteopontin, Decorin (auch bezeichnet als Larry Fisher-7

bzw. -4) und Osteocalcin sind Primärantikörper, welche kommerziell nicht erhältlich sind. Sie wurden auf der Basis einer wissenschaftlichen Kooperation mit dem NIDH, Bethesda, Washington D.C., USA (Arbeitsgruppe Larry Fisher), freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Nach Inkubieren des Primärantikörpers über Nacht und Waschen der Präparate mit TBS, wurde der FITC-konjugierte Antikörper aufgetragen und bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte ein erneutes Waschen und dann Auftragen von DAPI zur Kernfärbung.



**Abb. 4** Austesten der Immunfluoreszenzmethode an Zellkulturen von Osteosarkom-Zelllinien, durch Anwendung unterschiedlicher Fixierungen und Antikörper.

**a** Zelllinie SAOS; Fix: Paraformaldehyd in PBS; Antikörper gegen Vimentin; x 63

**b** Zelllinie TE 85; Fix: Ethanol/Eisessig; Antikörper gegen Vimentin; x 63

**c** Zelllinie TE 85; Fix: Paraformaldehyd in PBS; Antikörper gegen Vimentin; x 40

**d** Zelllinie TE 85; Fix: Ethanol/Eisessig; Antikörper gegen Vimentin; x 40



### **5.1.2 Austesten der MMP- und TIMP-Antikörper**

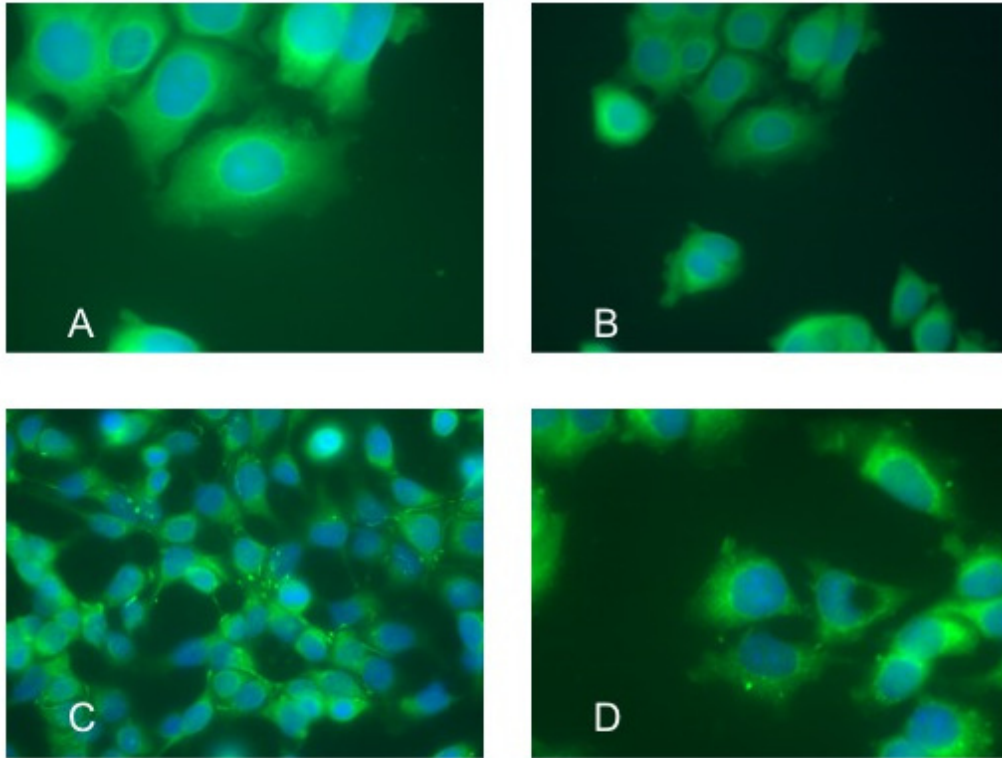
Im nächsten Schritt wurden die ausgewählten Antikörper gegen die MMPs und TIMPs ausgetestet. Hierfür wurden zunächst ebenfalls Zellkulturen eingesetzt. Wir benutzten dafür die Mamma-Carcinom-Zelllinie MCF-7, da Mamma-Carcinome bzw. Mamma-Carcinom-Zelllinien vom Hersteller als Positivkontrolle angegeben wurden. Die Zellkulturen wurden in der oben beschriebenen Art und Weise der Immunfluoreszenz zugeführt und in weiteren Testreihen auch der konventionellen Immunhistologie mit APAAP.

Die einzelnen Antikörper wurden in Verdünnungsreihen ausgetestet, um eine optimale Verdünnung zu finden.

Im Folgenden mussten die Immunfluoreszenzmethode übertragen werden auf die Anwendung an Paraffinschnitten. Hierfür wurde humane Placenta eingesetzt, da dies ebenfalls als Positivkontrolle für die MMPs und die TIMPs angegeben wurde.

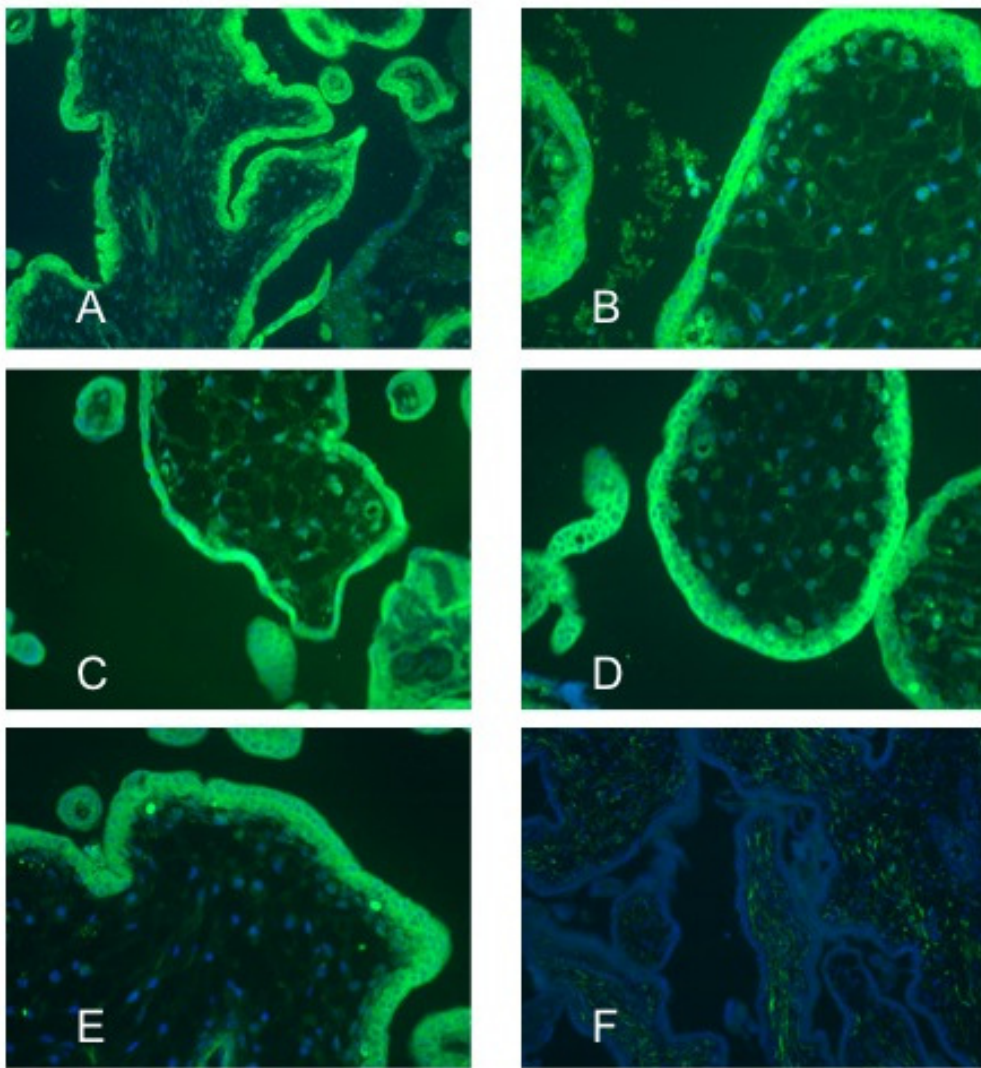
Nach Entparaffinieren der Präparate wurden die Placenta-Schnitte, ebenso wie die Zellkulturen, der Immunfluoreszenz und der Immunhistologie mit APPAP zugeführt.

Nachdem die Antikörper in dieser Weise ausgetestet wurden, konnte eine Anwendung der Antikörper am Knochen erfolgen. Durch mehrere Testreihen wurde auch hier zunächst eine optimale Verdünnung der Antikörper gesucht. Der weitere Vorgang der Behandlung und Färbung der Knochenproben wird in Kapitel 5.4.1 genauestens erläutert.



**Abb. 5** Austesten der MMP-Antikörper an der Mamma-Carcinom-Zelllinie MCF-7.

**a** MMP 2; x 63 **b** MMP 2; x 40 **c** MMP 14; x 40 **d** MMP 14; x 63



**Abb. 6** Austesten der MMP-Antikörper an Paraffinschnitten humaner Plazenta. Humane Plazenta wurde vom Hersteller der Antikörper als Positivkontrolle angegeben. **a** Antikörper gegen TIMP 4; x 10. **b** Antikörper gegen TIMP 2; x 20. **c** Antikörper gegen MMP 14; x 20. **d** Antikörper gegen MMP 13; x 20. **e** Antikörper gegen MMP 2; x 40. **f** Negativkontrolle mit einem Antikörper gegen Desmin; x 10.

### **5.1.3 Austesten der Antikörper für die morphometrischen Berechnungen**

Für die morphometrischen Berechnungen mussten wir zunächst Methoden finden, um Osteoklasten und Osteoblasten jeweils selektiv anfärben zu können. Zum Markieren der Osteoklasten wurde monoklonales mouse-anti-human CD68, clone PG-M1, eingesetzt. Von diesem ist bekannt und hinreichend belegt, dass er sich hervorragend eignet zum Markieren von Monozyten/Makrophagen, zu deren Gruppe man auch die Osteoklasten zählt.

Um die Osteoblasten selektiv anfärben zu können, wurden mehrere Färbemethoden ausgetestet. Zunächst wurde nach einer Markierungsmethode für alkalische Phosphatase gesucht (Moss et al.; 1982 und Miao et al.; 2002). Alle unterschiedlichen Färbungen für alkalische Phosphatase bedurften verschiedener Vorbehandlungen, um unspezifische Anfärbungen zu verhindern. Diese Vorbehandlungen waren allerdings mit den Schnittpräparaten des Knochens nicht vereinbar und führten zum Abschwimmen der Knochenschnitte vom Objektträger.

Nach ausführlicher Recherche wurde der monoklonale mouse-anti-human Plasmacell-Antikörper, clone VS38c gefunden. Dieser markiert neben Plasmacellen und Epithelien auch aktive Osteoblasten. Die Osteoblasten konnten hiermit selektiv und ohne unspezifische Nebenfärbungen markiert werden (Sulzbacher et al.; 1997).

## **5.2 Knochenproben/Einteilung der Patientengruppen**

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben handelt es sich um formalinfixierte, EDTA-entkalkte und paraffin-eingebettete Beckenkammbiopsien die vorrangig im Rahmen hämatologischer Fragestellung im pathologischen Institut der Justus-Liebig Universität Gießen untersucht wurden. Insgesamt wurden einundsechzig Fälle in die Studie aufgenommen, bei denen sich keine Knochenmarkserkrankungen ergaben. Zum Vergleich der Auswirkung und des Vorhandenseins der Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren wurden die Fälle in sechs Gruppen nach dem Geschlecht und nach dem Alter der Patienten unterteilt: < 45 Jahren, zwischen 45 und 70 Jahren und > 70 Jahren.

Da es sich um eine retrospektive Studie aus Archivmaterial des pathologischen Institutes handelt, konnte ein „informed consent“ der betroffenen Patienten nicht eingeholt werden. Zur Beachtung der ethischen Vorgaben nach der Deklaration von Helsinki wurden die für die Studie ausgewählten Biopsien anonymisiert, so dass lediglich Alter und Geschlecht als Untersuchungsmerkmale erkennbar waren.

Tabelle 1: Aufteilung in unterschiedliche Patientenkollektive

	<b>Männliche Patienten</b>	<b>Weibliche Patienten</b>
<b>Altersgruppe &lt; 45 Jahren</b>	n = 10	n = 10
<b>Altersgruppe 45 – 70 Jahre</b>	n = 10	n = 12
<b>Altersgruppe &gt; 70 Jahren</b>	n = 10	n = 9

### **5.3 Antikörper**

Zum immunhistologischen Nachweis der Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren wurden aus der Gruppe der über zwanzig MMPs drei Proteinasen ausgewählt. Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit waren Metalloproteinasen, welche als Substrat die Proteine des Knochens umsetzen. Aus den drei Gruppen der Matrix-Metalloproteinasen (Collagenasen, Gelatinasen, Stomelysin) wurden deshalb unter den Collagenasen (=MMP13) und unter den Gelatinasen (=MMP2) jeweils eine MMP ausgewählt. Bei dieser Auswahl wurden MMPs berücksichtigt, welche in der Literatur bereits im Zusammenhang mit Knochen erwähnt wurden. Außerdem wurde MMP 14 (MT-MMP1) als membranständige MMP untersucht.

Nach derzeitigem Kenntnisstand sind vier für den Knochen bedeutsame TIMPs bekannt, welche alle untersucht wurden.

Tabelle 2:

Ausgewählte Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und ihre Inhibitoren (TIMP):

<b><u>MMP 2:</u></b>	<p>Hierbei handelt es sich eine Gelatinase mit 72 kDa. Synonyme sind Gelatinase A und Typ IV Collagenase.</p> <p>Substrate, welche von MMP 2 umgesetzt werden:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Collagen I, II, III, V, VII, X</li><li>- Elastin</li><li>- Fibronectin</li><li>- Gelatin</li><li>- Procollagenase-3</li></ul>
<b><u>MMP 13:</u></b>	<p>Auch als Collagenase-3 benannt.</p> <p>Substrate, welche von MMP 13 umgesetzt werden:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Aggrecan</li><li>- Collagen I, II, III</li><li>- Gelatin</li><li>- Tenascin</li></ul>

<b><u>MMP 14:</u></b>	<p>Bei MMP 14 handelt es sich um eine membranständige Metalloproteinase, sie wird deswegen auch als MT-MMP 1 bezeichnet.</p> <p>Substrate, welche von MMP 14 ungesetzt werden:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Collagen I, II, III</li> <li>- Fibronectin</li> <li>- Procollagenase-3</li> <li>- Progelatinase A</li> <li>- Pro-MMP2</li> <li>- Proteoglycane</li> </ul>
<b><u>TIMP 1:</u></b>	<p>Glykoprotein; 28,5 kDa.</p> <p>Bildet einen 1:1 Komplex mit aktivierter 72 kDa Typ-IV-Collagenase (= MMP 2) und 92 kDa Typ-IV-Collagenase (= MMP 9).</p>
<b><u>TIMP 2:</u></b>	<p>Protein mit 21 kDa; bildet, wie TIMP 1 einen 1:1 Komplex mit MMP 2 und MMP 9.</p>
<b><u>TIMP 3:</u></b>	<p>Glykoprotein; 23 kDa</p>
<b><u>TIMP 4:</u></b>	<p>Glykoprotein; 23 kDa</p>

Zur Untersuchung der Immunreaktivität der Antikörper erfolgte eine Testung der verschiedenen Antikörper parallel an Schnitten von humanem Plazentagewebe, welches aus untersuchtem Gewebematerial von Plazenta (ebenfalls anonymisiert) aus dem Archiv des pathologischen Institutes zur Verfügung stand.

Als Negativ-Kontrolle wurden die Beckenkammbiopsien und die Plazentagewebeschnitte in gleicher Weise parallel mit Keratin inkubiert und angefärbt.

Um die durch die MMP- und TIMP-Antikörper markierten Strukturen als Fluoreszenzsignal sichtbar zu machen erfolgte eine Koppelung mit FITC-markierten Antikörpern und einer Behandlung mit DAPI zur Kerndarstellung.

Bei FITC (Fluoresceinisothiocyanat) handelt es sich um einen Reaktivfarbstoff, welcher nach Anregung durch das spezielle blaue Licht des Fluoreszenzmikroskopes (Wellenlänge 496 nm) grünes Licht der Wellenlänge 520 bis 530 nm abgibt. Konnte man also unter dem Fluoreszenzmikroskop sehen, dass die Knochenzellen grün leuchteten, wurde dies als positiv gewertet. Zur Kerndarstellung wurde ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff, das DAPI verwendet. Bei DAPI handelt es sich ebenfalls um einen Fluoreszenzfarbstoff (4',6-Diamidino-2-phenylindol). Dieser bindet an DNA, eignet sich also zur Darstellung der Zellkerne. Bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert DAPI blau.



## **5.4 Immunhistochemische Methoden**

### **5.4.1 Methoden der Immunfluoreszenz**

Bei unserem Vorgehen handelt es sich um die Methode der indirekten Immunfluoreszenz.

Die formalinfixierten, EDTA-entkalkten und paraffin-eingebetten Schnitte der unterschiedlichen Beckenkammbiopsien wurden zunächst auf den Färbevorgang vorbereitet, indem sie in absteigender Xylol/Alkohol-Reihe entparaffiniert wurden. Hierzu wurden sie zunächst zweimal für 5 Minuten in Xylol und dann für jeweils drei Minuten in 100% Ethanol, 100% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, 70% Ethanol und aqua dest gewaschen. Danach erfolgte ein Waschen in TBS und anschließend erfolgte eine Vorbehandlung der Schnitte für 10 Minuten in Triton X<sub>100</sub> (Fa. Merck) und erneutes Waschen mit TBS. Im Anschluss wurden die Schnitte für eine Stunde, zum Blocken von unspezifischen Reaktionen, mit 3% BSA (Fa. Merck) in TBS-Tween (0,1%) behandelt. Nach erneutem Waschen der Schnitte mit TBS wurden die primären MMP- / TIMP- Antikörper, bzw. der Keratin-Antikörper als Negativkontrolle, aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper-Verdünnungen wurden zuvor in Test-Reihen ausgetestet:

MMP2 1:75; MMP13 1:60; MMP14 1:125; TIMP1 1:20; TIMP2 1:25; TIMP3 1:150; TIMP4 1:20; Keratin 1:200. (Alle MMP- und TIMP- Antikörper von Fa. Chemicon; Keratin-Antikörper von Fa.Dianova).

Nach Abspülen der überschüssigen Antikörperlösung mit TBS, wurden die Schnittpräparate mit den FITC-konjugierten Antikörpern (1:200 Fa.Dianova), für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte erneutes Waschen mit TBS zum Abspülen der überschüssigen FITC-Lösung, anschließend wurden die Präparate zum Anfärben der Zellkerne mit DAPI ( Fa. Serva) in einer Verdünnung 1:10000 inkubiert. Danach erfolgte ein einmaliges Waschen mit aqua dest und Eindecken der Schnitte mit Vectashield antifade.

#### **5.4.2 Methoden der Immunhistochemie mit enzymatischer Detektion**

Zur histomorphometrischen Berechnung der Knochenoberfläche wurden die aktiven Zellen der endostalen Oberflächen mittels immunhistochemischen Methoden angefärbt.

Tabelle 3: Ausgewählte Antikörper zum Anfärben von Osteoblasten und Osteoklasten

<b><u>VS 38 C:</u></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- monoklonaler mouse-anti-human Plasmacell-Antikörper, clone VS38c;</li><li>- 63 kDa schweres, nicht glykosyliertes Transmembranprotein Typ II, welches in Plasmazellen, Epithelien und rauem ER vorkommt.</li><li>- der Antikörper markiert aktive Osteoblasten (Sulzbacher et. al. , 1997)</li></ul>
<b><u>CD 68:</u></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- monoklonaler mouse-anti human CD 68-Antikörper, clone PG-M1</li><li>- das Antigen ist ein hochgradig glykosyliertes, lysosomales Membranprotein mit Expression auf der Oberfläche von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und Basophilen</li><li>- markiert auch Osteoklasten, da diese zur Gruppe der Monozyten/Makrophagen gehören</li></ul>

Die formalinfixierten, EDTA-entkalkten und paraffin-eingebetten Schnitte der Beckenkämme wurden, wie bereits beschrieben, in einer Xylol/Alkohol-Reihe entparaffiniert. Nach Waschen mit TBS wurden die Schnitte zur Epitopdemaskierung hitzebehandelt. Hierfür wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) in den Dampfkessel gestellt und so für 40 Minuten vorbehandelt. Um ein Abschwimmen der Schnitte vom Objektträger zu verhindern, wurden spezielle Objektträger eingesetzt (Objektträger der Fa. DAKO und Super-Frost-Objektträger der Fa. R. Langenbrink) und diese wurden zusätzlich mit Poly-L-Lysin beschichtet.

Im Anschluss an die Hitzebehandlung erfolgte erneutes Waschen mit TBS und dann Aufbringen der primären Antikörper. Der Antikörper gegen CD 68 (Clone: PG-M1 Fa. DAKO) in einer Verdünnung 1:250 und VS38c in einer Verdünnung 1:25 (Fa.DAKO), danach Inkubieren über Nacht. Am nächsten Tag wurde zunächst die überschüssige Antikörper-Lösung mit TBS abgewaschen und danach erfolgte das Aufbringen des

unverdünnten Link- Antikörpers aus dem APAAP-Kit der Fa. DAKO für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen, wurden die Schnitte mit dem unverdünnten APAAP-Immunkomplex aus dem APAAP-Kit für 30 min inkubiert. Nach Abwaschen des überschüssigen Immunkomplexes Aufbringen der Entwicklungslösung des Kits, welches zuvor frisch nach Anleitung im Kit gemischt wurde, und Inkubieren für 25 Minuten. Im Anschluss erneutes Waschen und dann Färbung der Zellkerne mit Hämalaun für eine Minute. Zum Stoppen der Färbereaktion wurden die Schnittpräparate zunächst mit warmem Leitungswasser und anschließend mit aqua dest gespült. Am Ende wurden die Präparate eingedeckt mit DAKO-Glycergel.

## **5.5 Knochenmorphometrie**

Zur Immunhistochemischen Markierung der endostalen Knochenoberfläche wurden Osteoklasten und Osteoblasten selektiv angefärbt. Dies stellt die Grundlage dar, für die histomorphometrischen Berechnungen.

Zur Berechnung der „aktiven Knochenoberfläche“ in Form von aktiven Osteoklasten und aktiven Osteoblasten wurden Messungen mit dem modifizierten Merz-Gitter durchgeführt. Nach Bestimmung der „aktiven Knochenoberflächenanteile“ lassen sich die inaktiven Knochenoberflächenanteile, welche von lining cells bedeckt sind, berechnen.

Das hierfür eingesetzte Merz-Gitter besteht aus parallel verlaufenden, aneinander gereihten Halbkreisen. Auf diesen Halbkreisen liegen jeweils mittig Messpunkte. Bei den Messungen handelt sich um Punktzählverfahren. Voraussetzungen für den Einsatz des Merz-Gitters ist die Ungerichtetheit und zufällige Verteilung der auszumessenden Struktur (Anisotropie), in diesem Falle die Trabekelstruktur der Knochenspongiosa. Durch Auszählen von Schnittpunkten, Begrenzungslinien und nachfolgende Berechnungen, kann vom zweidimensionalen Schnittpräparat (Planimetrie), durch weitere Rechenschritte die Gewebeverteilung im dreidimensionalen Raum berechnet werden (Walter A. Merz, 1967)

Zur Messung der „aktiven“ Knochenoberfläche wurden Osteoklasten und Osteoblasten markiert und die so markierten Oberflächen ausgemessen. Die nicht angefärbten und somit nicht gemessenen Oberflächen entsprechen der von lining cells bedeckten „inaktiven“ endostalen Knochenoberfläche.

Zur Einordnung der untersuchten Biopsiegruppen nach normaler Knochenmasse und verminderter Knochenmasse (Osteoporose), wurde auch die volumetrische Dichte der Spongiosa ermittelt.

Tabelle 4: Histomorphometrische Parameter

<b>Bone Area (BAr)</b>	Flächenpunkt des Merz-Gitters welche auf der Knochenstruktur liegen x $(1/10 d)^2$ *
<b>Tissue Area (TAr)</b>	Anzahl der mit dem Merz-Gitter ausgezählten Gesichtsfelder x $d^2$
<b>Bone Volume</b>	$(BAr/TAr) \times 100$
<b>Bone Perimeter (BPm)</b>	Schnittpunkte der Wellenlinien des Merz-Gitters mit der Knochenoberfläche x $1/10 d$
<b>Osteoblast Perimeter (ObPm)</b>	Schnittpunkte der Wellenlinien des Merz-Gitters mit markierten Osteoblasten x $1/10 d$
<b>Osteoclast Perimeter (OcPm)</b>	Schnittpunkte der Wellenlinien des Merz-Gitters mit markierten Osteoclasten x $1/10 d$
<b>Osteoblast Surface</b>	$(ObPm/BPm) \times 100$
<b>Osteoclast Surface</b>	$(OcPm/BPm) \times 100$
<b>Osteoclast number</b>	Anzahl der Osteoklasten pro TAr ( $mm^2$ )

\* d= Die Länge des mit dem Merzgitter ausgemessenen Bereiches auf dem Objektträger/Präparat bei einer Vergrößerung x 100. Im Vorliegenden Fall ist d = 0,87 mm.

## **6. Ergebnisse**

### **6.1 Ergebnisse der Morphometrie**

Die Ergebnisse der morphometrischen Ausmessungen, nach selektiver Anfärbung von Osteoklasten und Osteoblasten und Berechnung der Knochenoberfläche, welche von lining cells bedeckt ist, werden zunächst in tabellarischer Ansicht dargestellt.

Tabelle 5 zeigt die unterschiedlichen ausgemessenen Parameter, welche hauptsächlich zur weiteren Berechnung benötigt wurden. Tabelle 6 dient dann zur Darstellung der weiteren Ergebnisse:

Tabelle 5 zeigt unterschiedliche Werte: Zum Einen Werte, welche mit Hilfe des Merzgitters ausgemessen wurden. Hierzu zählen die Flächenpunkte, d.h. die Messpunkte auf den Halbkreisen des Merzgitters, welche auf der Knochenstruktur liegen. Weiterhin die Anzahl der mit dem Merzgitter ausgemessenen Gesichtsfelder, sowie die Anzahl der Schnittpunkte der Halbkreise des Merzgitters mit der Knochenoberfläche. Außerdem die Anzahl der Schnittpunkte des Merzgitters mit Osteoblasten bzw. Osteoklasten und die Anzahl der im Schnitt vorhandenen Osteoklasten (nicht farblich unterlegter Teil der Tabelle). Diese Werte dienen lediglich der Berechnung der gesuchten Parameter. Berechnet werden konnte hiermit die „Bone area“, die „Tissue area“ und der „Bone perimeter“, welche ebenfalls nur weiteren Berechnungen dienen (hellgrau unterlegter Teil der Tabelle). Mit Hilfe dieser Werte kann man nun das „Bone volume“ berechnen, welches eine Aussage ermöglicht über den prozentualen Anteil des Knochens in dem jeweils vorliegenden Schnitt (dunkelgrau unterlegter Teil der Tabelle). Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Osteoporose ziehen.

Tabelle 5: Ergebnisse der morphometrischen Messungen und Berechnungen

Flächen- punkte	Anzahl Gesichts- felder	Schnitt- punkte Knochen	Schnitt- punkte OB	Schnitt- punkte OC	OC	Bone Area	Tissue Area	Bone Perimeter	Bone Volume (%)
349	31,35	360	11	6	8	2,641581	23,728815	31,32	11,1323764
184	11,5	258	11	2	7	1,392696	8,70435	22,446	16
446	18,65	325	183	2	7	3,375774	14,116185	28,275	23,9142091
259	26,4	278	42	8	13	1,960371	19,98216	24,186	9,81060606
89	9,7	101	12	1	2	0,673641	7,34193	8,787	9,17525773
283	30,4	349	46	2	8	2,142027	23,00976	30,363	9,30921053
399	14,65	342	116	0	2	3,020031	11,088585	29,754	27,2354949
363	16,9	350	55	6	15	2,747547	12,79161	30,45	21,4792899
313	16,4	395	32	4	12	2,369097	12,41316	34,365	19,0853659
226	7,5	355	244	8	18	1,710594	5,67675	30,885	30,1333333
286	19	422	55	3	9	2,164734	14,3811	36,714	15,0526316
75	14,3	213	7	0	2	0,567675	10,82367	18,531	5,24475524
220	10,9	227	6	0	3	1,66518	8,25021	19,749	20,1834862
649	34,25	946	40	9	17	4,912281	25,923825	82,302	18,9489051
83	6,4	126	12	0	4	0,628227	4,84416	10,962	12,96875
293	10,55	350	21	0	5	2,217717	7,985295	30,45	27,7725118
139	9,9	128	4	2	5	1,052091	7,49331	11,136	14,040404
194	11,5	268	15	3	7	1,468386	8,70435	23,316	16,8695652
250	13,3	296	6	2	7	1,89225	10,06677	25,752	18,7969925
268	18,7	353	17	2	4	2,028492	14,15403	30,711	14,3315508
144	13,3	311	5	3	8	1,089936	10,06677	27,057	10,8270677
135	8,4	240	4	0	7	1,021815	6,35796	20,88	16,0714286
286	10,4	243	2	3	5	2,164734	7,87176	21,141	27,5
144	6,6	218	18	16	26	1,089936	4,99554	18,966	21,8181818
138	7,5	202	29	2	6	1,044522	5,67675	17,574	18,4
168	14,8	262	0	1	6	1,271592	11,20212	22,794	11,3513514

173	14,1	280	3	4	11	1,309437	10,67229	24,36	12,2695035
127	9,9	244	6	0	1	0,961263	7,49331	21,228	12,8282828
168	4,8	190	6	0	1	1,271592	3,63312	16,53	35
133	10,3	166	0	1	3	1,006677	7,79607	14,442	12,9126214
227	15,3	282	17	1	4	1,718163	11,58057	24,534	14,8366013
181	8	152	19	3	7	1,369989	6,0552	13,224	22,625
142	10	156	3	3	1	1,074798	7,569	13,572	14,2
200	12,5	292	3	5	14	1,5138	9,46125	25,404	16
191	7,7	215	2	0	1	1,445679	5,82813	18,705	24,8051948
141	6,5	208	5	3	7	1,067229	4,91985	18,096	21,6923077
125	7,9	189	7	0	3	0,946125	5,97951	16,443	15,8227848
117	4	122	12	1	4	0,885573	3,0276	10,614	29,25
252	10,6	232	14	2	6	1,907388	8,02314	20,184	23,7735849
103	5,3	126	7	2	4	0,779607	4,01157	10,962	19,4339623
120	9,3	203	6	2	6	0,90828	7,03917	17,661	12,9032258
198	8,4	207	6	2	5	1,498662	6,35796	18,009	23,5714286



Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der weiteren Berechnungen. Die „Osteoclast number“ gibt an, wie viele Osteoklasten sich im Präparat befinden, bezogen auf die Gewebemenge im Präparat (nicht farblich unterlegter Teil der Tabelle). Weiterhin zeigt die Tabelle den „Osteoblast-„ und „Osteoclast Perimeter“, d.h. Schnittpunkte des Merzgitters bezogen auf das gesamte Präparat (hellgrau unterlegter Teil der Tabelle). Diese Parameter dienen nur zur weiteren Berechnungen der Osteoclast surface bzw der Osteoblast surface (dunkelgrau unterlegter Teil der Tabelle). Diese zeigen wie viel Prozent der endostalen Knochenoberfläche von Osteoklasten bzw. Osteoblasten bedeckt sind. Auf Grund dieser Berechnungen konnten wir die „aktive“ Knochenoberfläche bestimmen. Die restliche endostale Knochenoberfläche ist von lining cells bedeckt (gelb unterlegter Teil der Tabelle).

Tabelle 6: Ergebnisse der weiterführenden Berechnungen der Morphometrie

Osteoclast number (mm <sup>2</sup> )	Osteoblast Perimeter	Osteoclast Perimeter	Osteoblast Surface (%)	Osteoclast Surface (%)	lining cell surface (%)
0,33714284	0,957	0,522	3,05555556	1,66666667	95,2777778
0,8041956	0,957	0,174	4,26356589	0,7751938	94,9612403
0,49588469	15,921	0,174	56,3076923	0,61538462	43,0769231
0,65058032	3,654	0,696	15,1079137	2,87769784	82,0143885
0,27240794	1,044	0,087	11,8811881	0,99009901	87,1287129
0,34767855	4,002	0,174	13,1805158	0,5730659	86,2464183
0,18036566	10,092	0	33,9181287	0	66,0818713
1,17264363	4,785	0,522	15,7142857	1,71428571	82,5714286
0,96671597	2,784	0,348	8,10126582	1,01265823	90,8860759
3,17082838	21,228	0,696	68,7323944	2,25352113	29,0140845
0,62582139	4,785	0,261	13,0331754	0,71090047	86,2559242
0,18478021	0,609	0	3,28638498	0	96,713615
0,36362711	0,522	0	2,64317181	0	97,3568282
0,65576743	3,48	0,783	4,22832981	0,95137421	94,820296
0,82573656	1,044	0	9,52380952	0	90,4761905
0,62615094	1,827	0	6	0	94
0,66726186	0,348	0,174	3,125	1,5625	95,3125
0,8041956	1,305	0,261	5,59701493	1,11940299	93,2835821
0,6953571	0,522	0,174	2,02702703	0,67567568	97,2972973
0,28260502	1,479	0,174	4,81586402	0,56657224	94,6175637
0,79469383	0,435	0,261	1,60771704	0,96463023	97,4276527
1,10098208	0,348	0	1,66666667	0	98,3333333
0,63518197	0,174	0,261	0,82304527	1,2345679	97,9423868
5,20464254	1,566	1,392	8,25688073	7,33944954	84,4036697
1,05694279	2,523	0,174	14,3564356	0,99009901	84,6534653
0,5356129	0	0,087	0	0,38167939	99,6183206
1,03070662	0,261	0,348	1,07142857	1,42857143	97,5

0,13345237	0,522	0	2,45901639	0	97,5409836
0,27524552	0,522	0	3,15789474	0	96,8421053
0,38480927	0	0,087	0	0,60240964	99,3975904
0,34540614	1,479	0,087	6,02836879	0,35460993	93,6170213
1,15603118	1,653	0,261	12,5	1,97368421	85,5263158
0,13211785	0,261	0,261	1,92307692	1,92307692	96,1538462
1,47971991	0,261	0,435	1,02739726	1,71232877	97,260274
0,17158162	0,174	0	0,93023256	0	99,0697674
1,42280761	0,435	0,261	2,40384615	1,44230769	96,1538462
0,50171335	0,609	0	3,7037037	0	96,2962963
1,32117849	1,044	0,087	9,83606557	0,81967213	89,3442623
0,74783688	1,218	0,174	6,03448276	0,86206897	93,1034483
0,99711584	0,609	0,174	5,55555556	1,58730159	92,8571429
0,85237322	0,522	0,174	2,95566502	0,98522167	96,0591133
0,78641577	0,522	0,174	2,89855072	0,96618357	96,1352657

Tabelle 7 zeigt die Mittelwerte sowie Standardabweichungen der berechneten Parameter in Prozent. Alle untersuchten Knochenpräparate wurden berücksichtigt. Hierbei sieht man, dass wir nachweisen konnten, dass über 90% der endostalen Knochenoberfläche von den vermeintlich inaktiven lining cells bedeckt sind, während nur etwa 9,9% der endostalen Knochenoberfläche von aktiven Osteoklasten und Osteoblasten bedeckt sind.

In Diagramm 1 werden diese Ergebnisse erneut dargestellt. Es wird deutlich, welchen großen Anteil der endostalen Knochenoberfläche die lining cells ausmachen.

Tabelle 7: Ergebnisse der morphometrischen Berechnungen

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Bone Volume (%)</b>	15,96	6,76
<b>Osteoblast Surface (%)</b>	8,89	6,60
<b>Osteoclast Surface (%)</b>	1,03	1,13
<b>Lining cell Surface (%)</b>	90,08	7,12

**Diagramm 1:** Anteile der unterschiedlichen Knochenzellen an der endostalen Knochenoberfläche (%)

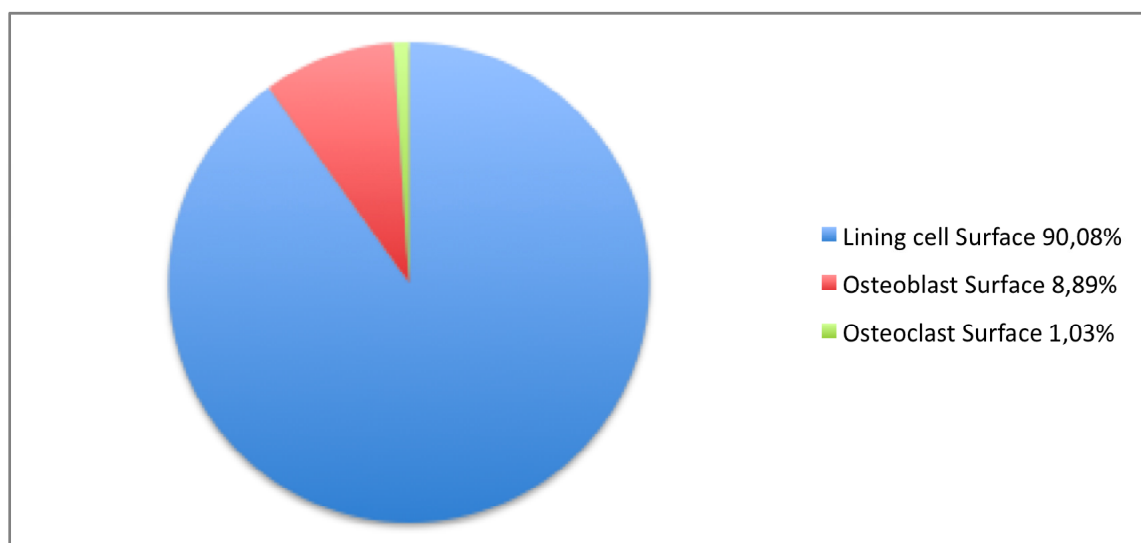


Tabelle 8 zeigt, ähnlich wie Tabelle 7 die Ergebnisse der Berechnungen im Patientenkollektiv. Hier allerdings unterteilt nach Alter und Geschlecht der Patienten. Man sieht, dass sich der Prozentsatz der von lining cells bedeckten Knochenoberfläche mit zunehmendem Alter erhöht, bei gleichzeitiger Abnahme der „Osteoblast-„ bzw. „Osteoclast surface“.

Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse aus Tabelle 8 inklusive Standardabweichungen.

Tabelle 8: Ergebnisse der morphometrischen Berechnungen nach Alter und Geschlecht

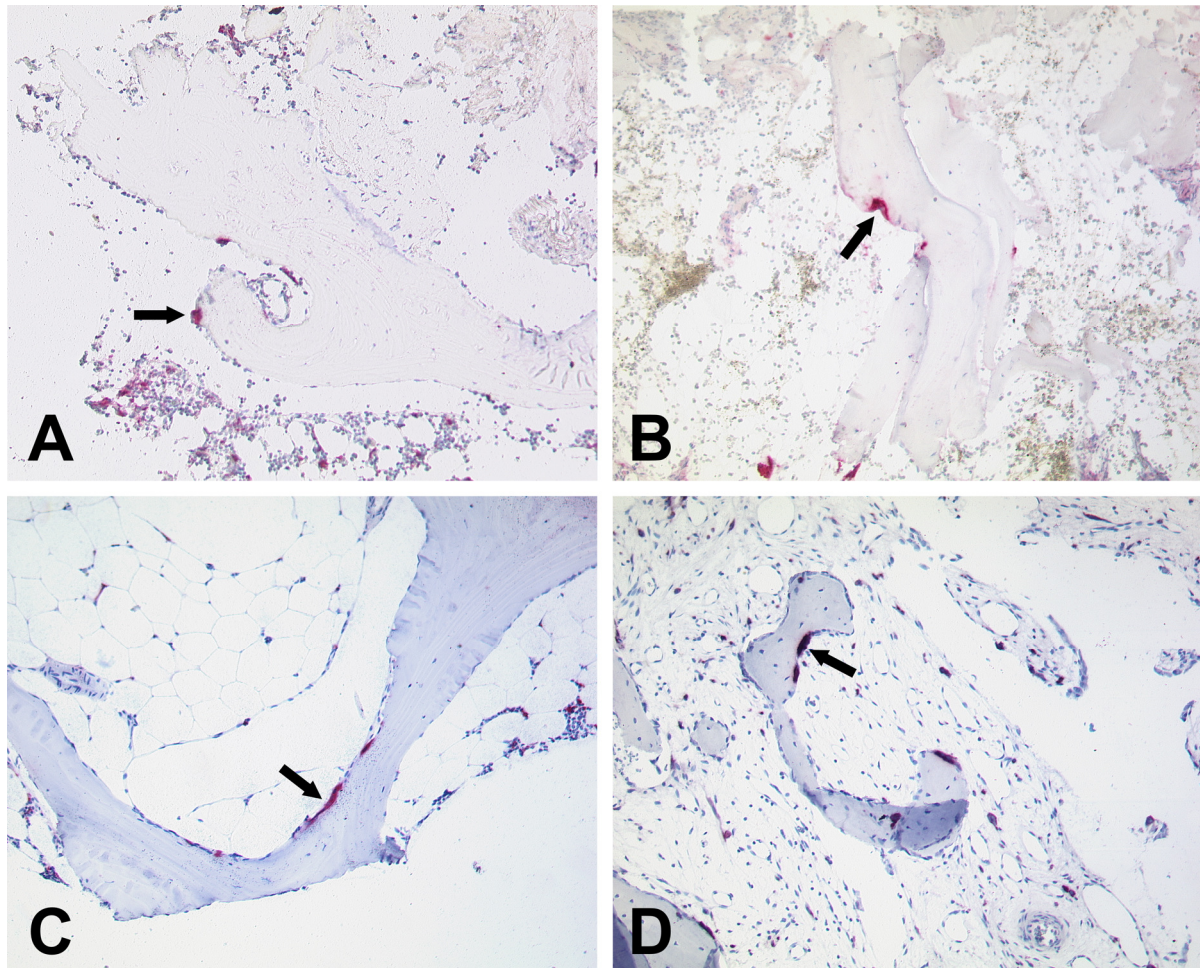
	<b>Bone Volume (%)</b>	<b>Osteoblast Surface (%)</b>	<b>Osteoclast Surface (%)</b>	<b>Lining cell surface (%)</b>
<b>W &lt; 45</b>	22,09	3,87	0,38	95,73
<b>W 45-70</b>	14,03	6,77	1,26	91,93
<b>W &gt; 70</b>	12,28	6,85	0,91	92,22
<b>M &lt; 45</b>	17,77	4,68	0,62	94,70
<b>M 45-70</b>	10,81	4,98	1,02	93,97
<b>M &gt; 70</b>	15,16	2,83	0,83	96,31

Tabelle 9: Ergebnisse der Morphometrie mit Standardabweichung

<b>W &lt; 45 Jahre</b>		
	<b>Mittelwert</b>	<b>Standard-abweichung</b>
<b>Bone Volume(%)</b>	22,09	9,22
<b>Osteoblast Surface (%)</b>	3,87	2,48
<b>Osteoclast Surface (%)</b>	0,38	0,40
<b>Lining cell Surface (%)</b>	95,73	2,39
<b>M &lt; 45 Jahre</b>		
	<b>Mittelwert</b>	<b>Standard-abweichung</b>
<b>Bone Volume (%)</b>	17,77	2,65
<b>Osteoblast Surface (%)</b>	4,68	2,40
<b>Osteoclast Surface (%)</b>	0,62	0,50
<b>Lining cell Surface (%)</b>	94,70	2,77
<b>W 45 – 70 Jahre</b>		
	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Bone Volume (%)</b>	14,03	4,63
<b>Osteoblast Surface (%)</b>	6,77	5,90
<b>Osteoclast Surface (%)</b>	1,26	0,76
<b>Lining cell Surface (%)</b>	91,93	6,09
<b>M 45 – 70 Jahre</b>		
	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Bone Volume (%)</b>	10,81	3,79
<b>Osteoblast Surface (%)</b>	4,98	3,98
<b>Osteoclast Surface (%)</b>	1,02	0,78
<b>Lining cell Surface (%)</b>	93,97	3,91
<b>W &gt; 70 Jahre</b>		
	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Bone Volume (%)</b>	12,28	5,25
<b>Osteoblast Surface (%)</b>	6,85	6,34
<b>Osteoclast Surface (%)</b>	0,91	0,68
<b>Lining cell Surface (%)</b>	92,22	6,65
<b>M &gt; 70 Jahre</b>		
	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Bone Volume (%)</b>	15,16	6,64
<b>Osteoblast Surface (%)</b>	2,83	2,49
<b>Osteoclast Surface (%)</b>	0,83	0,56
<b>Lining cell Surface (%)</b>	96,31	2,82

## 6.2 Darstellung der Ergebnisse der Morphometrie

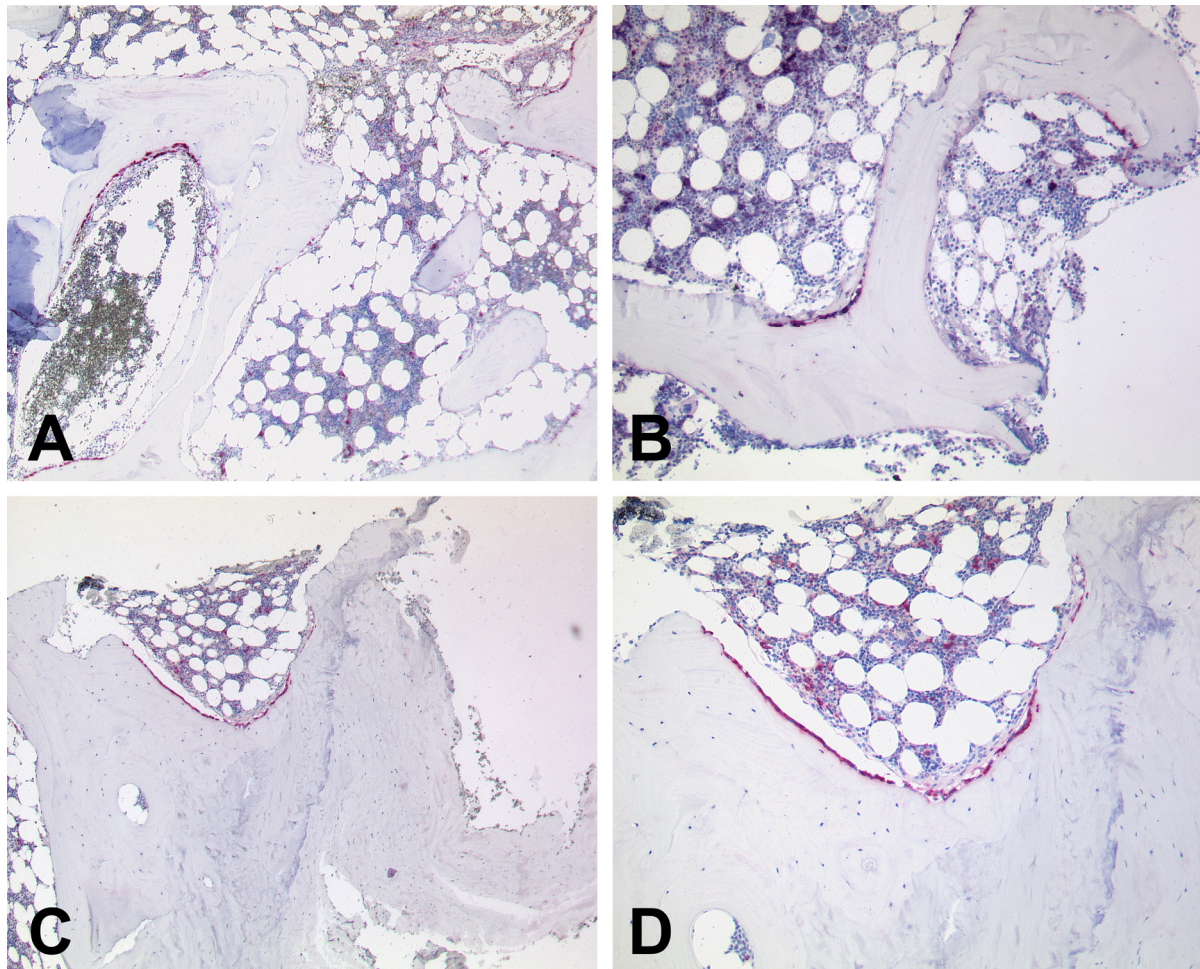
### 6.2.1 Darstellung der Osteoklasten mit CD 68



**Abb. 7** Die Abbildungen **a** bis **d** zeigen unterschiedliche Knochenproben, welche alle mit einem Antikörper gegen CD 68 inkubiert wurden. Hiermit wurden die Osteoklasten, sowie Abkömmlinge von Makrophagen im Knochenmark markiert. Man erkennt deutlich die großen, mehrkernigen Osteoklasten, welche Lakunen in der endostalen Knochenoberfläche gebildet haben (Pfeilmarkierung). Die rot markierte endostale Knochenoberfläche wurde mit Hilfe des Merzgitters ausgemessen und in weiteren Schritten berechnet. (alle x 100)



### 6.2.2 Darstellung der Osteoblasten mit VS38c



**Abb. 8** Die Abbildungen zeigen Knochenschnitte welche mit dem Antikörper gegen VS38c inkubiert und angefärbt wurden. Markiert wurden hiermit Osteoblasten. Es zeigen sich deutlich rot angefärbte Osteoblastensäume an der endostalen Knochenoberfläche. Man sieht eine scharfe Grenze zwischen Knochenabschnitten mit aktiven Osteoblasten und weitgehend „inaktiver“, d.h. nicht von Osteoblasten bedeckter Knochenoberfläche. Die rot markierte Fläche wurde in die morphologischen Ausmessungen und Berechnungen einbezogen. **a** und **b** x 100; **c** und **d** zeigen den selben Schnitt in unterschiedlichen Vergrößerungen (**c** x 50; **d** x 100).



### **6.3 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung**

In Tabelle 10 wird gezeigt, in wieviel Prozent der untersuchten Präparate ein positives Signal in der Immunfluoreszenz festzustellen war. Hierbei wurde eine grüne Färbung der Zellen als positiv gewertet. Keine Anfärbbarkeit der endostalen Knochenoberflächenzellen, d.h. kein grünes Signal nach Anregung mit dem Fluoreszenzmikroskop, wurde als negative Reaktion gewertet.

Als Negativkontrolle wurden die Präparate mit einem Antikörper gegen Keratin, in gleicher Weise wie mit den TIMP-/MMP-Antikörpern inkubiert. Hierbei zeigte sich keinerlei positive Reaktion.

Es zeigte sich, dass im gesamten Patientenkollektiv MMP 13, MMP 14 und TIMP 1 in nahezu allen Proben nachweisbar waren. Ein positives Immunfluoreszenzsignal konnte festgestellt werden in lining cells (MMP 13 war hier in 86,6% der Fälle positiv, MMP 14 und TIMP 1 in 96,6%) und Osteoblasten (MMP 13 in 93% positiv und MMP 14 und TIMP 1 in 96%) und etwas weniger ausgeprägt auch in den Osteozyten. Etwas weniger häufig, aber noch in über 70% der lining cells und Osteoblasten nachweisbar, war TIMP 2.

MMP 2 konnte noch in gut einem Drittel der untersuchten Proben nachgewiesen werden, mit einer positiven Reaktion der lining cells bei 33,3% der untersuchten Präparate und einer positiven Reaktion der Osteoblasten in 40% der untersuchten Fälle.

In den wenigsten Fällen konnten TIMP 3 und TIMP 4 nachgewiesen werden.

Insgesamt war festzustellen, dass die Osteozyten sowohl bei MMPs, als auch bei den TIMPs weniger häufig ein positives Signal zeigten, als lining cells und Osteoblasten. Dies ist auf die geringere metabolische Funktion dieser Zellen zurückzuführen.

Tabelle 10 Positive Immunfluoreszenzreaktion in % der untersuchten Fälle.

	<b>MMP 2</b>	<b>MMP 13</b>	<b>MMP 14</b>	<b>TIMP 1</b>	<b>TIMP 2</b>	<b>TIMP 3</b>	<b>TIMP 4</b>	<b>Keratin</b>
<b>Lining cells</b>	33,3	86,6	96,6	96,6	76,6	6	23	0
<b>Osteoblasten</b>	40	93	96	96	72	8	25	0
<b>Osteozyten</b>	13	65	63	88	50	1	8	0

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung nach Unterteilung des Patientenkollektives in Gruppen nach Alter und Geschlecht.

Es zeigte sich, dass MMP 2 bei Frauen, im Vergleich zu Männern derselben Altersgruppe häufiger nachzuweisen war. Bei TIMP 3 war dies ebenso der Fall. Bei den restlichen MMPs und TIMPs war kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern feststellbar.

Tabelle 11 Positive Immunfluoreszenzreaktion in % der untersuchten Fälle

	MMP 2	MMP 13	MMP 14	TIMP 1	TIMP 2	TIMP 3	TIMP 4	Keratin
<b>&lt; 45 Jahren männl.</b>								
lining cells	10	90	90	90	90	0	40	0
Osteozyten	10	60	40	80	40	0	30	0
Osteoblasten	10	90	90	90	80	0	40	0
<b>&lt; 45 Jahre weibl.</b>								
lining cells	60	90	100	100	70	10	30	0
Osteozyten	30	60	50	90	40	10	10	0
Osteoblasten	70	100	90	100	70	10	30	0
<b>45-70 Jahre männl.</b>								
lining cells	20	80	100	100	70	0	10	0
Osteozyten	20	60	70	100	40	0	10	0
Osteoblasten	50	100	100	100	80	0	20	0
<b>45-70 Jahre weibl.</b>								
lining cells	45	90	100	90	82	9	27	0
Osteozyten	0	73	64	82	55	0	0	0
Osteoblasten	45	82	100	90	82	18	27	0
<b>&gt; 70 Jahre männl.</b>								
lining cells	30	90	100	100	80	10	20	0
Osteozyten	20	90	80	90	50	0	0	0
Osteoblasten	20	90	100	100	70	10	20	0
<b>&gt; 70 Jahre weibl.</b>								
lining cells	44	67	89	100	67	11	11	0
Osteozyten	0	33,3	56	89	56	0	0	0
Osteoblasten	45	67	100	100	67	11	11	0

## **MMPs und TIMPs in Lining cells**

In den Tabellen 12 und 13 wurden die Ergebnisse für die in der vorliegenden Arbeit besonders betrachteten lining cells gesondert dargestellt. Tabelle 12 zeigt hierbei, in wie viel Prozent der untersuchten Fälle ein positiver Nachweis der jeweiligen MMPs und TIMPs möglich war.

Etwas detaillierter zeigen sich die Ergebnisse in Tabelle 13. Hier wurden die in Ergebnisse unterteilt nach Alter und Geschlecht dargestellt.

Hierbei wird wieder deutlich, wie bereits oben erwähnt, dass es möglich war, in den lining cells sowohl die proteolytischen MMPs, als auch ihre Gegenspieler, die TIMPs nachzuweisen. Besonders häufig waren MMP 13, in 86,6% der untersuchten Fälle, und MMP 14 und TIMP 1 in jeweils 96,6%. MMP 2 konnte noch in gut einem Drittel der untersuchten Knochenproben gefunden werden, während TIMP 3 und TIMP 4 mit 6% bzw. 23% eher zu vernachlässigen sind.

Tabelle 12 Positive Immunfluoreszenzreaktion in % der untersuchten Fälle.

	<b>MMP 2</b>	<b>MMP 13</b>	<b>MMP 14</b>	<b>TIMP 1</b>	<b>TIMP 2</b>	<b>TIMP 3</b>	<b>TIMP 4</b>
<b>Positiv markierte lining cells (%)</b>	33,3	86,6	96,6	96,6	76,6	6	23

Tabelle 13 Positive Immunfluoreszenzreaktion in % der untersuchten Fälle.

	<b>MMP 2</b>	<b>MMP 13</b>	<b>MMP 14</b>	<b>TIMP 1</b>	<b>TIMP 2</b>	<b>TIMP 3</b>	<b>TIMP 4</b>	<b>Keratin</b>
<b>m &lt;45</b>	10	90	90	90	90	0	40	0
<b>m 45-70</b>	20	80	100	100	70	0	10	0
<b>m &gt;70</b>	30	90	100	100	80	10	20	0
	<b>MMP 2</b>	<b>MMP 13</b>	<b>MMP 14</b>	<b>TIMP 1</b>	<b>TIMP 2</b>	<b>TIMP 3</b>	<b>TIMP 4</b>	<b>Keratin</b>
<b>w &lt;45</b>	60	90	100	100	70	10	30	0
<b>w 45-70</b>	45	90	100	90	82	9	27	0
<b>w &gt;70</b>	44	67	89	100	67	11	11	0

## **6.4 Darstellung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz**

Nach Vorbehandlung und Inkubation der Knochenschnitte mit den unterschiedlichen Antikörpern gegen MMPs und TIMPs, wurden die durch diese Antikörper markierten Zellen, mittels Immunfluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Knochenpräparate, wie bereits beschrieben, mit dem speziellen Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Die endostale Knochenoberfläche wurde in allen Präparaten eingehend mikroskopisch bezüglich der Stärke und Ausdehnung der Immunfluoreszenzmarkierung untersucht. Für die einzelnen MMPs und TIMPs ergaben sich die in Tabelle 12 und 13 aufgeführten unterschiedlichen Befunde. Exemplarisch sind diese Befunde in den folgenden Abbildungen zusammengestellt. Für MMP 2 zeigt sich eine uneinheitliche Markierung der endostalen Knochenoberfläche (Abb. 9 a-c), da es auch einzelne Abschnitte der Oberfläche ohne Fluoreszenzsignal (Abb. 9 c) gab. Diese uneinheitliche Markierung war nicht nur in den unterschiedlichen Präparaten erkennbar, sondern sie war teils auch innerhalb eines Präparates zu finden (Abb. 10 c), wie besonders bei der Darstellung von MMP 13 (Abb. 10 a – d) deutlich wurde. Hieraus wird offensichtlich, dass unterschiedliche Skelettabschnitte sich in unterschiedlichen Umbauphasen befinden. Wie extrem flach die lining cells dem Knochen aufliegen, wird deutlich in Abb. 12 b und Abb. 13 b. Hier sieht man einen sehr flachen Zellkern, welcher von nur von einem sehr geringen Zytoplasmasaum umgeben ist.

Bei unseren Untersuchungen wurde deutlich, dass lining cells keinesfalls einfach nur der endostalen Knochenoberfläche aufliegen. Wir konnten feststellen, dass die lining cells häufig in flachen Lakunen der Knochenoberfläche lagen (Abb 9 b; 10 a+b; 11 a; 13 c), was unsere Hypothese, dass lining cells in der Lage sind den Knochen langsam „abzuschmelzen“, stützt.

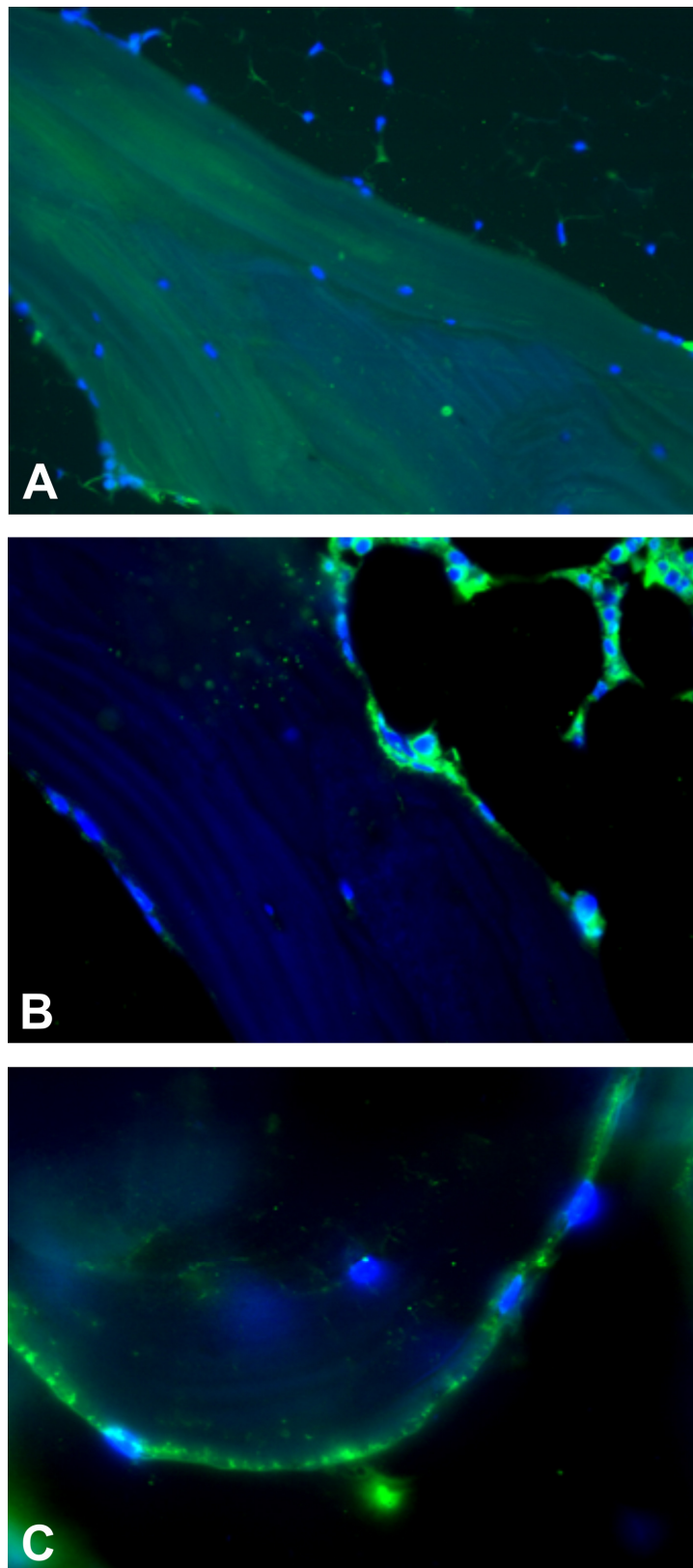
MMPs und TIMPs waren aber keinesfalls nur in den lining cells nachweisbar. Auch in Osteozyten konnten wir MMPs und TIMPs detektieren, und im Speziellen auch die Vernetzung der Osteozyten und lining cells miteinander (Abb. 10 d und 13 a).

Die unterschiedlichen MMPs und TIMPs waren in unterschiedlicher Häufigkeit in den lining cells nachweisbar, wie in Tabelle 12 deutlich wird. So waren MMP 14 und TIMP 1 in nahezu allen untersuchten Knochenproben positiv nachweisbar (Abb. 11 a-c und Abb. 12 a-c), während in TIMP 3 und TIMP 4 in den wenigsten Fällen zu

finden waren (Abb. 14 a-c und Abb. 15 a-c). Für MMP 2 waren teils keine, teils positive Signale feststellbar (Abb. 9 a-c).

Nach der Inkubation der Knochenpräparate mit dem Antikörper gegen Keratin, welcher als Negativkontrolle mitgeführt wurde, konnte in keinem Fall ein positives Signal festgestellt werden (Abb. 16 a-b). Lediglich einige Zellen im Knochenmark zeigen in diesen Proben eine positive Reaktion, da in diesen durchaus einige MMPs und TIMPs vorhanden sein können (Abb. 15 a und Abb. 16 b).

#### 6.4.1 MMP 2 in der Immunfluoreszenz



**Abb. 9** Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen MMP 2. Die Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt. **a** Hier ist kein positives Fluoreszenzsignal zu erkennen (x 20); **b** Blau markiert erkennt man die flachen Zellkerne der lining cells. Der Zellkörper fluoresziert grün. Die Zelle liegt in einer deutliche Lakune in der endostalen Knochenoberfläche (x 63); **c** Positiv markierte lining cells auf der endostalen Knochenoberfläche (x 63).

#### 6.4.2 MMP 13 in der Immunfluoreszenz

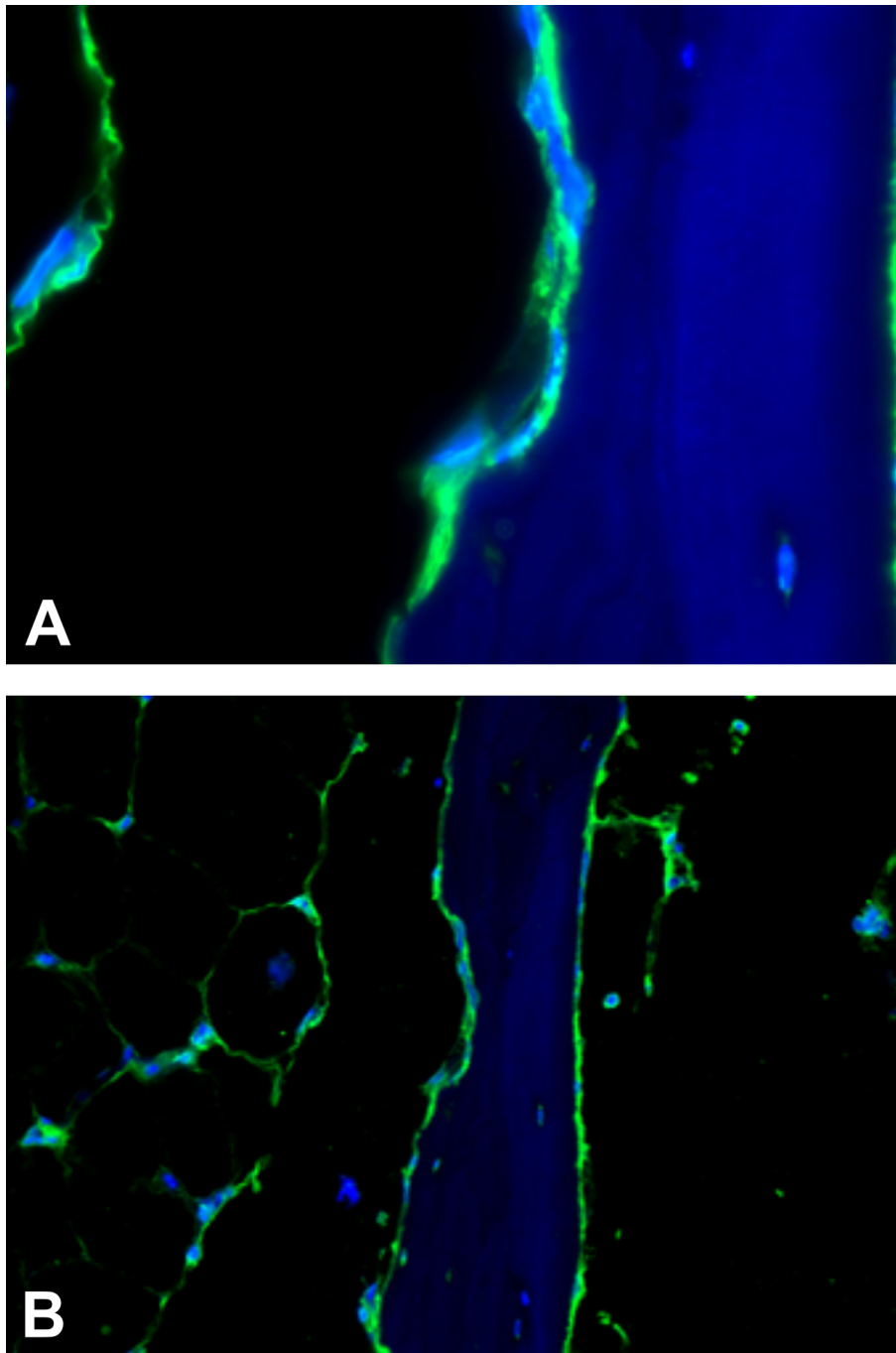
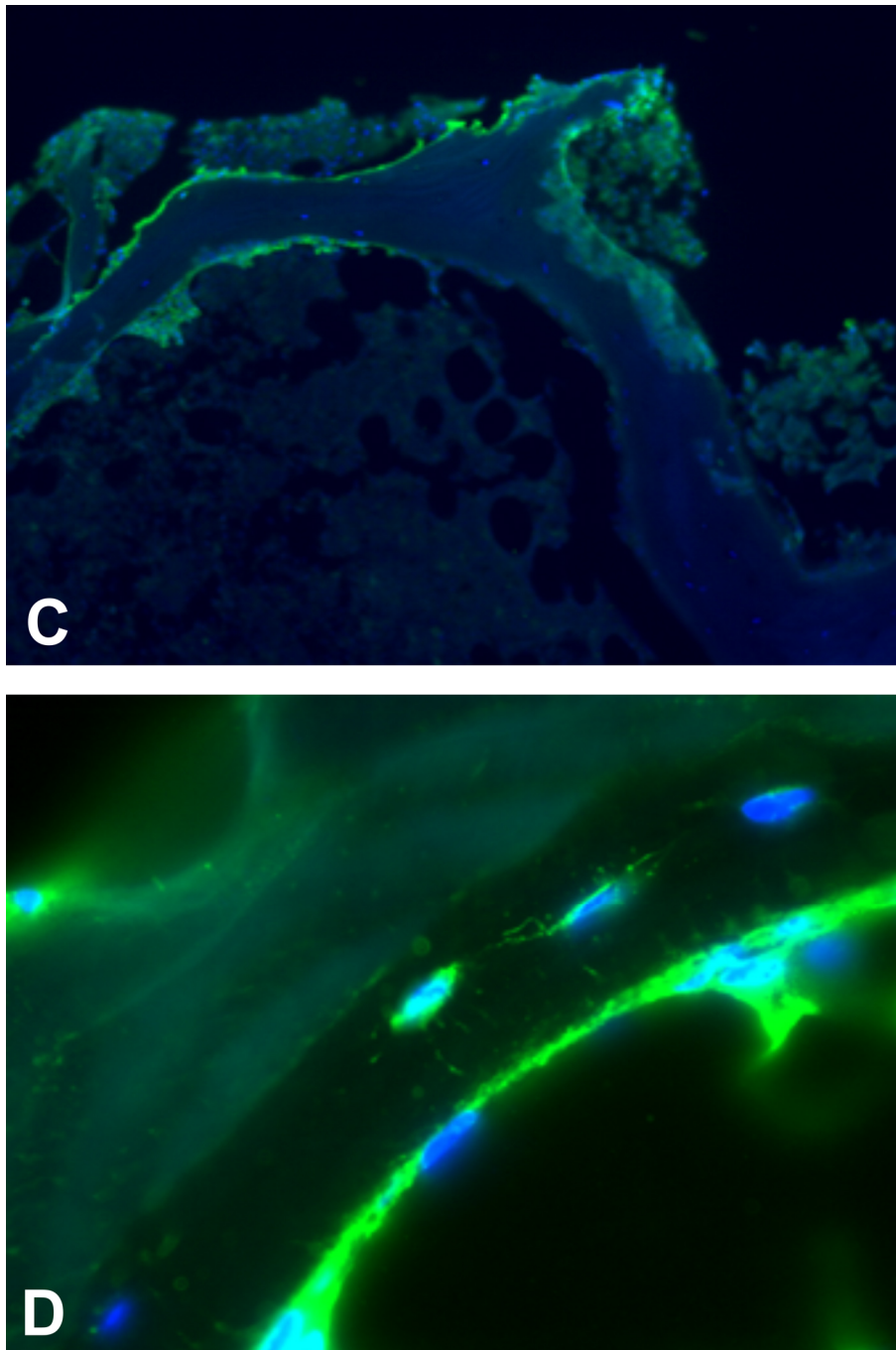


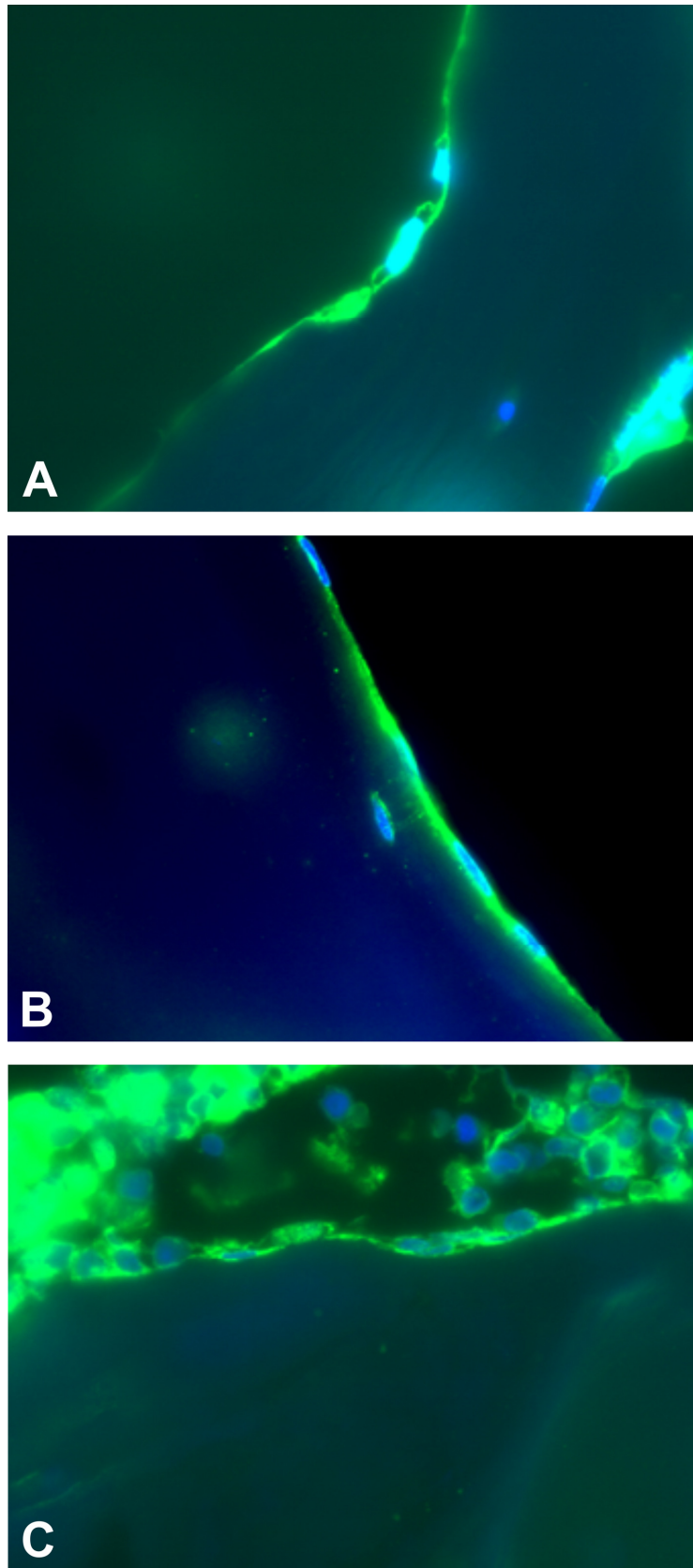
Abb. 10



**Abb. 10** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen MMP 13. **a** und **b** zeigen dasselbe Präparat, nur in unterschiedlichen Vergrößerungen (**a** x 63; **b** x 20). Man sieht einen Knochentrabekel mit einer deutlichen Lakune auf der linken Seite. In der Lakune befinden sich lining cells, erkennbar am flachen Kern. **c** zeigt in einer relativ geringen Vergrößerung eine Übersicht (x 10). Hier findet sich ein Abschnitt der endostalen Oberfläche, in dem MMP 13 nachweisbar ist und daran angrenzenden ein Bereich ohne Fluoreszenznachweis von MMP 13. In **d** wird deutlich, dass auch die Osteozyten über MMP 13 verfügen. Man sieht ein deutliches Fluoreszenzsignal, sowohl der Zellkörper der Osteozyten, als auch in den Zellausläufern dieser Zellen, welche sie mit Osteoblasten und lining cells verbinden (x63).

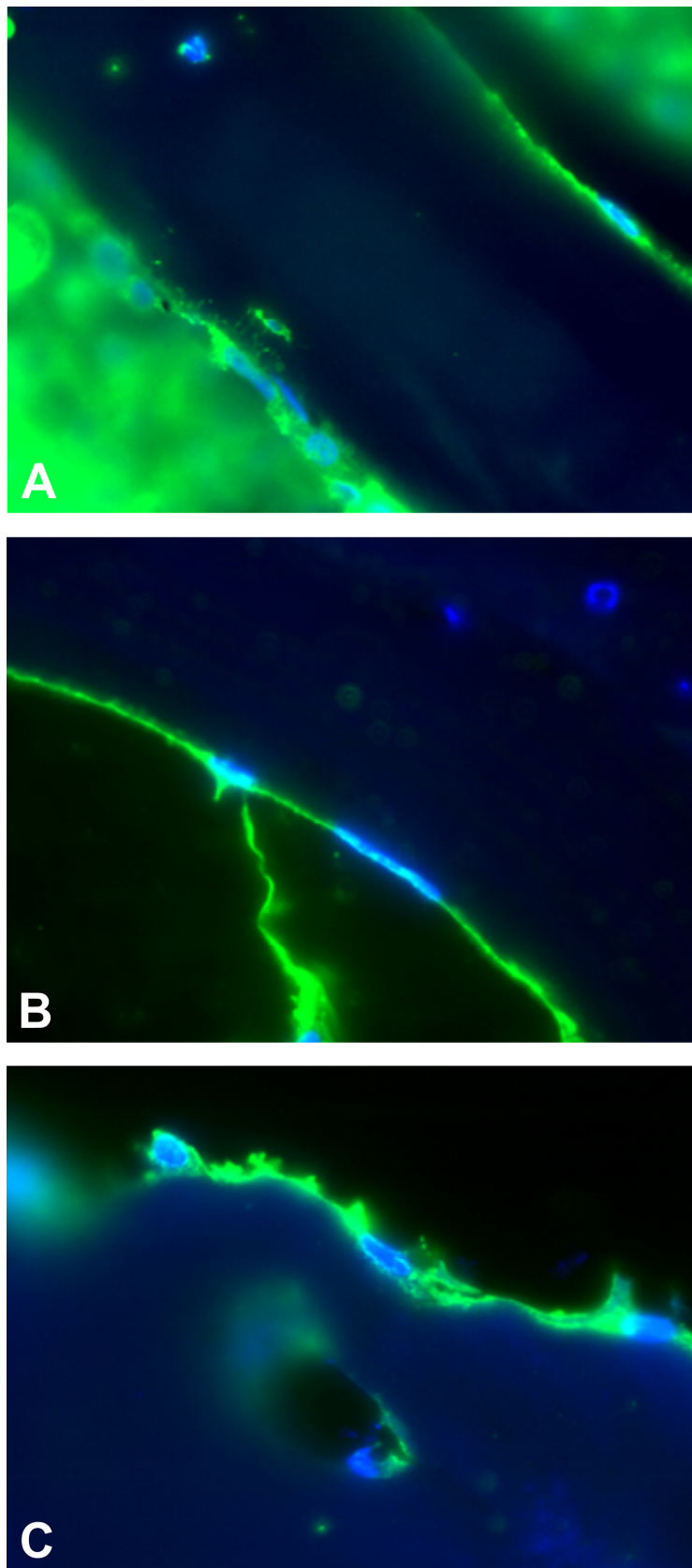


#### 6.4.3 MMP 14 in der Immunfluoreszenz



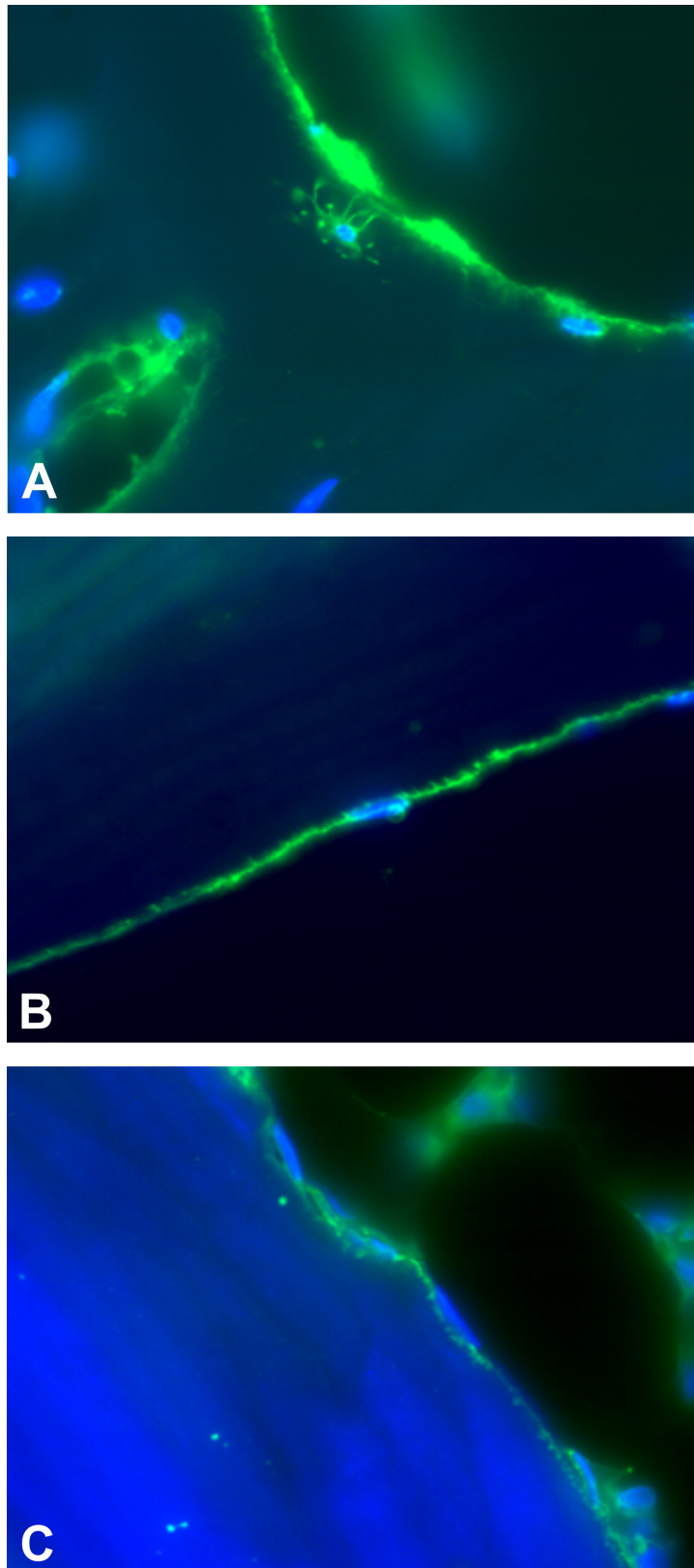
**Abb. 11** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen MMP 14. **a – c** Man sieht ein deutliches Signal der lining cells, welche zum Teil in tiefen Lakunen der endostalen Knochenoberfläche liegen. Auch die Osteozyten und deren Zellausläufer sind positiv, ebenso wie die Osteoblasten und einige Zellen des Markraumes (alle x 63).

#### 6.4.4 TIMP 1 in der Immunfluoreszenz



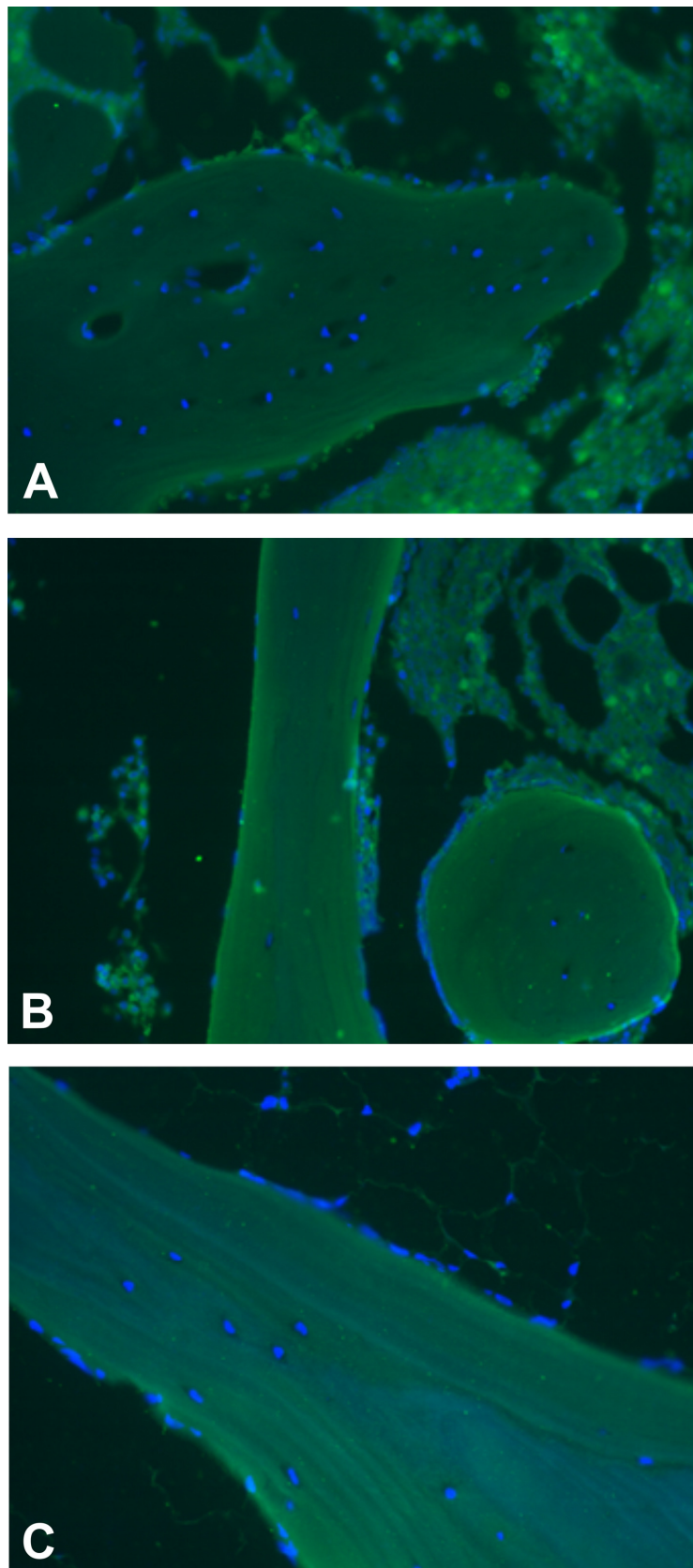
**Abb. 12** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen TIMP 1. In **b** wird deutlich wie flach sich die lining cells der Knochenoberfläche auflegen. **c** zeigt eine Lakune im Knochen in der sich lining cells befinden. TIMP 1 war in nahezu allen von uns untersuchten Knochenproben deutlich positiv nachweisbar (alle x 63).

#### 6.4.5 TIMP 2 in der Immunfluoreszenz



**Abb. 13** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen TIMP 2. In **a** wird deutlich, dass auch die Osteozyten über MMPs verfügen. Auch die Knochenkanälchen, welche lining cells und Osteozyten vernetzen, sind positiv markiert (x 63). **b** und **c** zeigen lining cells, die in flachen Lakunen der endostalen Knochenoberfläche aufliegen (x 63).

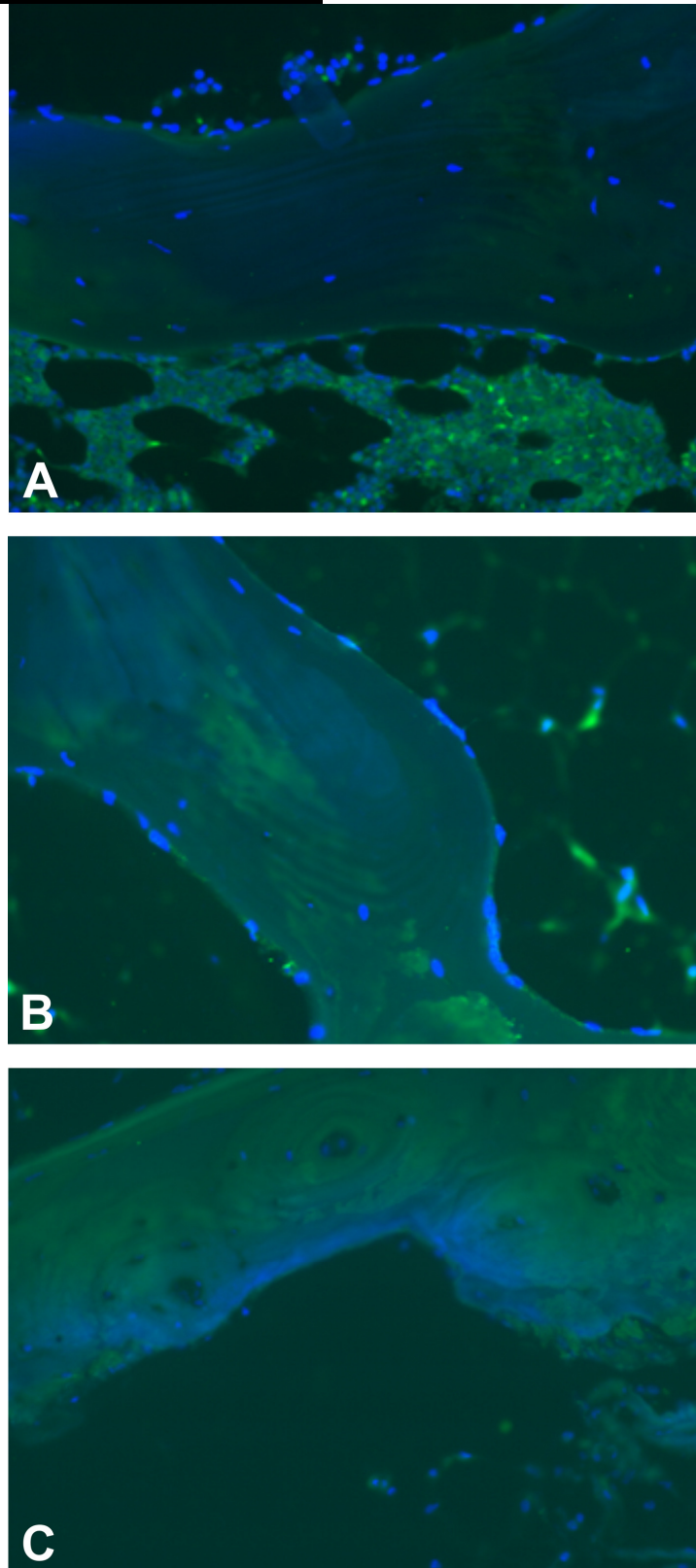
#### 6.4.6 TIMP 3 in der Immunfluoreszenz



**Abb. 14** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen TIMP 3. **a – c** Die Knochenzellen zeigen nahezu keine Immunfluoreszenzreaktion. Lediglich die Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt. Einige Zellen im Markraum zeigen eine positive Markierung. Die Knochenzellen sind negativ (a x 40; b und c x 20).

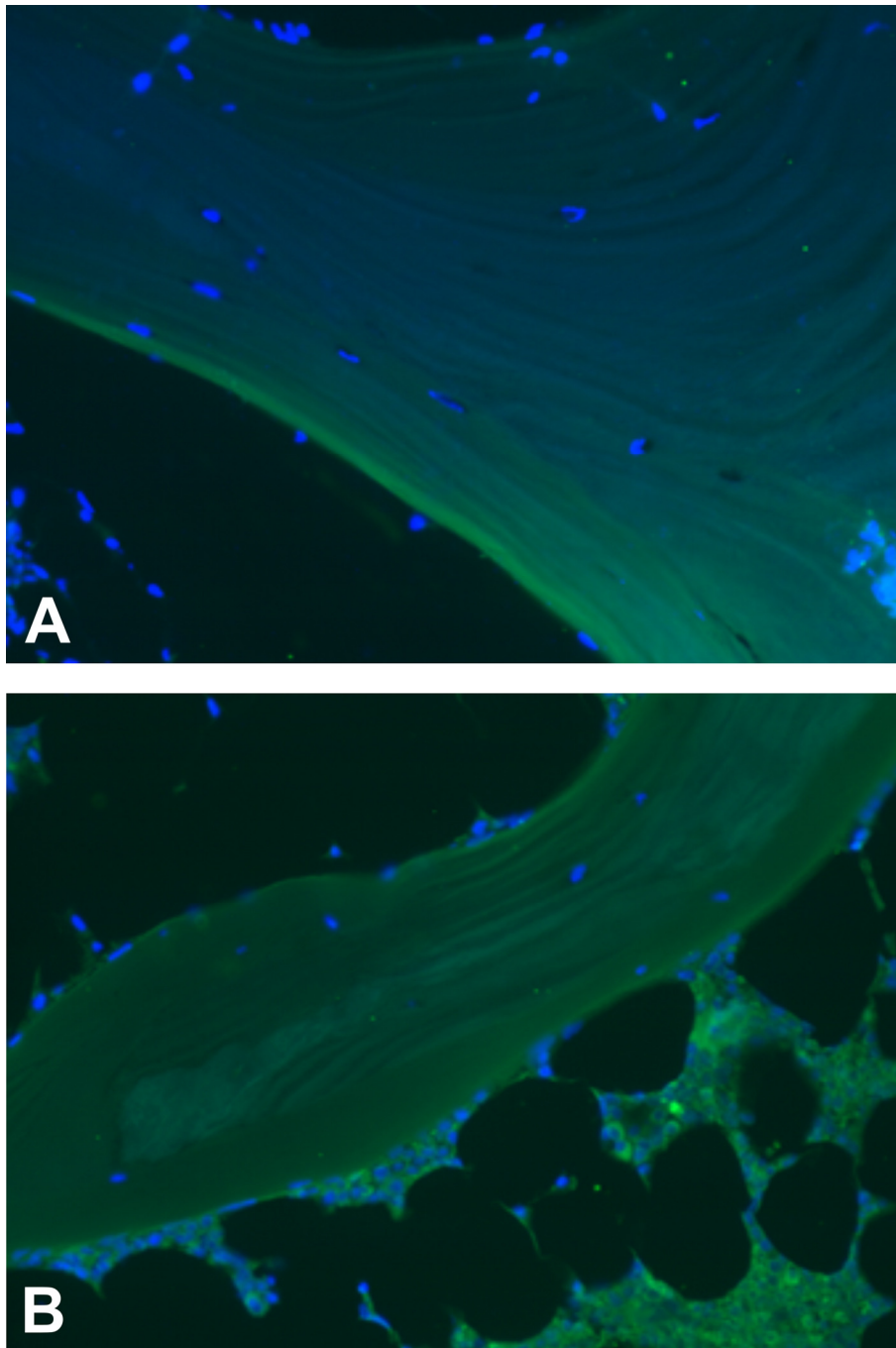


#### 6.4.7 TIMP 4 in der Immunfluoreszenz



**Abb. 15** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen TIMP 4. **a – c** Die Knochenzellen sind alle negativ, d.h. sie zeigen keinerlei Immunfluoreszenzreaktion. Lediglich die Zellkerne sind mit DAPI blau markiert (alle x20).

#### 6.4.8 Keratin in der Immunfluoreszenz



**Abb. 16** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Keratin. **a – c** Die Knochenzellen zeigen keine Immunfluoreszenzreaktion, d.h. sie sind negativ. Die Zellkerne sind mit DAPI blau markiert. Keratin wurde als Negativkontrolle verwendet; **a** x 63; **b** x 20.

## **7. Diskussion**

### **7.1 Knochenmorphometrie**

Der menschliche Knochen besteht aus kompaktem und spongiösem Knochengewebe. Die Grenzfläche zwischen Markraum und spongiösem Knochen ist die so genannte endostale Knochenoberfläche. An dieser Grenzfläche befinden sich, dem Knochen aufgelagert, Osteoblasten, Osteoklasten und lining cells. Je nach Aktivität des Knochenabschnittes unterscheidet sich der prozentuale Anteil dieser Zellen. Befindet sich der Knochen in einem Abbauprozess zeigen sich vermehrt Osteoklasten, bei Knochenanbau überwiegen Osteoblasten. Im Sinne des „remodelling“ des Knochens halten sich diese beiden Zellarten aber im Normalfall die Waage. Der weitaus größte Teil der endostalen Knochenoberfläche wird bedeckt von lining cells. Um diesen Anteil prozentual benennen zu können, wurden in dieser Arbeit morphometrische Berechnungen angestellt. Hierzu wurden Osteoblasten und Osteoklasten selektiv angefärbt und deren, die endostale Knochenoberfläche bedeckende Fläche, mittels eines Merzgitters ausgemessen und berechnet. Um die jeweiligen Zellen nachweisen zu können, wurden entsprechende Antikörper gesucht. Zur Markierung der Osteoblasten wurden zunächst einige Antikörper und Darstellungsmethoden für alkalische Phosphatase ausgetestet, da diese für Osteoblasten charakteristisch ist. Der immunhistochemische Nachweis der alkalischen Phosphatase in Osteoblasten bedarf zum verlässlichen Antigen-Retrieval einer Hitzevorbehandlung der Schnitte. Durch diese Vorbehandlungen wird die Struktur der Spongiosa der Knochenpräparate stark beschädigt. Eine methodisch einwandfreie morphometrische Auswertung der Schnitte ist danach nicht mehr möglich. Und auch alle anderen Färbemethoden für die alkalische Phosphatase (einschließlich der Enzymzytochemie) lieferten keine brauchbaren Ergebnisse, da hierbei die Osteoblasten nicht selektiv markiert wurden, und eine unspezifische Hintergrundfärbung eine Beurteilung unmöglich machte.

Das Problem der selektiven Darstellung aktiver Osteoblasten konnte im Rahmen der eigenen Untersuchungen durch den immunhistochemischen Einsatz eines Antikörpers gelöst werden, welcher eigentlich zur Detektion von Plasmazellen verwendet wird. Er eignet sich aber ebenfalls zur Markierung von Osteoblasten. Es handelt sich um den monoklonalen mouse-anti-human Plasmazell-Antikörper clone VS38c. Da der gleichzeitige Nachweis von Plasmazellen durch diesen Antikörper,

der ein zelluläres Strukturprotein markiert, nicht mit dem Nachweis aktiver Osteoblasten an der endostalen Knochenoberfläche interferiert, ergab sich eine zuverlässige Basis für die histomorphometrische Auswertung, der durch aktive Osteoblasten bedeckten endostalen Knochenoberfläche. Lining cells wurden durch den Antikörper nicht markiert (Sulzbacher et al.; 1997).

Zur Detektion der Osteoklasten wurde der monoklonale mouse-anti-human CD 68-Antikörper, clone PG-M1 ausgewählt. Dieser markiert die Zellen des Monozyten-Makrophagensystems, welchem die Osteoklasten zuzurechnen sind.

Für die Anwendung beider Antikörper war eine Vorbehandlung der Knochenpräparate zur Epitopdemaskierung nötig. Hierzu musste eine schonende Methode gefunden werden, da sich bei der sonst üblichen Vorbehandlung in der Mikrowelle die Knochenschnitte vom Objektträger lösten. Es zeigte sich, dass eine Kombination aus speziellen DAKO- bzw. Super-Frost-Objektträgern, beschichtet mit Poly-L-Lysin, und einer Hitzebehandlung im Dampfkessel mit Citratpuffer zu einem sehr guten Ergebnis führte, dass die Knochenstruktur der Spongiosa für die histomorphometrischen Auswertungen erhielt.

Die von Osteoblasten bzw. Osteoklasten bedeckte endostale Knochenoberfläche konnte somit selektiv markiert und ausgemessen werden. Hierbei konnten wir beweisen, dass etwa 90% der endostalen Knochenoberfläche von lining cells bedeckt werden, während auf die aktiven Knochenzellen lediglich noch 10% entfallen.

Dies belegt den auch von anderen Autoren mitgeteilten Befund, einer starken Abnahme aktiver endostaler Knochenoberfläche im erwachsenen Skelett, und untermauert die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese. Die Ursache einer Osteoporose kann danach nicht ausschließlich in den lediglich 10% der endostalen Knochenoberfläche zu finden sein, welche sich in aktiven Umbauprozessen befinden. Vielmehr ist eine weitere Ursache in den vermeintlich ruhenden Zellen der endostalen Knochenoberfläche, den lining cells, welche 90% dieser Fläche bedecken, zu suchen. Hinweise auf katabole Funktionen von lining cells ergeben sich auch aus analogen Befunden an anderen Zellformen des Bindegewebes. Es konnte nachgewiesen werden, dass Fibroblasten, die eine den „bone lining cells“ verwandte mesenchymale Zellform darstellen, in der Leber zum Abbau einer Fibrose durch MMPs beitragen (Roderfeld et al.; 2007). Daher kann angenommen werden, dass mesenchymale Zellen des Bindegewebes nicht nur anabole Eigenschaften



einer Proteinsynthese, sondern auch katabole Eigenschaften des Proteinabbaus besitzen, oder durch Regulationsmechanismen zwischen anabolen und katabolen Phasen wechseln können.

## **7.2 Immunfluoreszenz**

Die Methode der Immunfluoreszenzfärbung ist eine ausgezeichnete Möglichkeit, um einzelne Zellen und Strukturen im Gewebe darzustellen. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um die Matrix-Metalloproteinasen und deren Gegenspieler in den lining cells nachzuweisen. Zur Etablierung der Methodik der Immunfluoreszenz wurden Knochenproben mit den entsprechenden Antikörpern gegen MMPs und TIMPs inkubiert und dann mit FITC-markierten Antikörpern gekoppelt. Zur Kernfärbung der Präparate diente der Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Als Nachteil bei der Immunfluoreszenzmethode erwies sich, dass die so markierten Präparate relativ schnell an Leuchtkraft verloren. Dieser Vorgang konnte etwas verzögert werden durch Eindecken der fertig gefärbten Präparate mit Vectashield Antifade (Fa. Vector). Bei der Auswertung der so behandelten Knochenproben, wurden die einzelnen Knochenzellen (Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten) und unter besonderer Beachtung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit, die lining cells betrachtet. Hierbei wurde darauf geachtet, ob bei den einzelnen Zelltypen, markiert mit den entsprechenden Antikörpern gegen MMPs und TIMPs, ein positives grünes Signal festzustellen war oder nicht. Die Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen wurde durch die Darstellung der Zellkerne mittels der DAPI-Färbung erleichtert. Einzeln liegende Zellen mit mehreren Zellkernen, welche häufig in Lakunen liegend gesehen werden konnten, wurden als Osteoklasten erkannt. Osteoblasten zeigten runde Zellkerne. Häufig lagen Osteoblasten als Osteoblastensaum der endostalen Oberfläche auf. Lining cells zeichneten sich aus durch extrem flache Kerne und eine sehr dünne Zyoplasmaschicht, welche direkt der endostalen Knochenoberfläche aufgelagert waren. Insbesondere beim Durchfokussieren durch die Präparate konnten Zell-Zell-Kontakte gut dargestellt werden. Dies zeigte sich durch schmale Ausläufer zwischen den Zellen, in welchen ein positives Signal ausgemacht werden konnte. Wir konnten dies zwischen den einzelnen lining cells, zwischen den Osteozyten, als auch als Vernetzung dieser beider Zelltypen untereinander darstellen. Die Vernetzung der Zellen untereinander belegt, dass die Knochenzellen gemeinsam als Netzwerk fungieren, welches in der Lage ist, auf äußere Einflüsse zu reagieren (H.Turner et al. 2002).

### **7.3 MMPs und TIMPs**

In der vorliegenden Arbeit konnte mit den von uns durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass die lining cells sowohl über die proteolytischen MMPs, als auch über deren Gegenspieler, die TIMPs verfügen. Dass lining cells keinesfalls ruhende, inaktive Zellen sind, wurde bereits mehrfach untersucht und belegt.

So wurde beispielsweise gezeigt, dass sie eine Rolle spielen beim „Säubern“ der Howship-Lakunen. Diese Lakunen entstehen beim Knochenabbau durch Osteoklasten. Nachdem die Osteoklasten die Degradation des Knochens abgeschlossen haben, hinterlassen sie Mulden in der Knochenoberfläche, welche in kürzester Zeit von lining cells besiedelt werden. In den lining cells der Howship-Lakunen konnten elektronenmikroskopisch die flachen Kerne, der Golgi-Apparat und ein Reichtum an rauem ER nachgewiesen werden, was davon zeugt, dass lining cells eine gewisse Aktivität und Syntheseleistung besitzen. Ebenfalls elektronenmikroskopisch nachzuweisen war die Vernetzung der lining cells untereinander über „gap junctions“. In der gleichen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass, nachdem die Osteoklasten die Howship-Lakunen verlassen hatten, in diesen noch demineralisierte Kollagenfibrillen nachweisbar waren. Diese wurden von den lining cells umlagert und abgebaut (Everts et al. 2002).

Hieraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass lining cells katabole Fähigkeit zu haben scheinen.

Die Rolle der MMPs in Abbauprozessen der Knochenmatrix, wurde bereits untersucht (Holmbeck et al. 2005). Dabei wurde speziell das Vorkommen und die Funktion des membranständigen MT-MMP 1, d.h. des MMP 14 analysiert. Dies scheint eine tragende Rolle bei der Bildung der Knochenkanälchen zu spielen, welche die Zellausläufer der Osteozyten enthalten. MMP 14 konnte vermehrt in der nahen Umgebung der Osteozyten nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen an „knock-out-Mäusen“, welchen MT-MMP 1 fehlte, konnten vermehrt Fehlbildungen dieser Knochenkanälchen festgestellt werden. Die Vernetzung der Osteozyten untereinander und mit den Zellen der endostalen Knochenoberfläche in Form von Osteoblasten und lining cells, war hier deutlich geringer, als dies bei Knochenproben von intakten (wild-typ-) Mäusen der Fall war (Holmbeck et al. 2005).

Auch in knochenaufbauenden Prozessen spielen MMPs eine Rolle, obwohl sie eine Gruppe proteolytischer Enzyme darstellen. So konnten sie unter anderem in den

Knochenzellen kindlicher Wachstumsfugen nachgewiesen werden. Hier scheinen sie zusammen mit Wachstumsfaktoren (VEGF; Vascular Endothelial Growth Factor) im gemeinsamen Wechselspiel für ein gerichtetes Knochenwachstum verantwortlich zu sein (Haeusler et al. 2003).

Nicht nur Matrix-Metalloproteinasen sind in den Knochenzellen nachweisbar, sondern auch deren Gegenspieler, die TIMPs. Im normalen Skelettsystem des Erwachsenen halten sich MMPs und TIMPs die Waage, so dass der Knochenaufbau und Abbau sich ausgleichen, es also zu keinem nennenswerten Knochenverlust bzw. zu keiner überschießenden Knochenbildung kommt. Gerät das Verhältnis von MMPs und TIMPs ins Ungleichgewicht, kommt es zu Störungen der Knochenstruktur im Sinne einer Osteopetrose (erhöhte Knochenmasse) oder einer Osteopenie/Osteoporose (verminderte Knochenmasse).

Bei einer Untersuchung an drei unterschiedlichen Knochentypen, es handelte sich hier um osteophytischen Knochen, heterotopen Knochen und neonatalen Rippenknochen, konnten MMPs in ähnlicher Ausprägung nachgewiesen werden, während die Expression von TIMPs, in dieser Untersuchung speziell des TIMP 1, signifikant unterschiedlich ausfielen (Bord et al. 1999). Die Expression von TIMP 1 war hier in den pathologisch veränderten Knochen, d.h. den osteophytischen Knochenproben und dem heterotopen Knochen sehr gering ausgeprägt. Im gesunden Knochen hingegen war TIMP 1 vermehrt nachweisbar, was zu der Schlussfolgerung führt, dass in gesundem Knochen, in welchem MMPs und TIMPs in ähnlich starker Ausprägung nachweisbar waren, sich diese beiden die Waage halten. In den pathologischen Knochenproben dagegen, war TIMP 1 supprimiert, so dass es zu einem Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs kam, woraus Fehlentwicklungen des Knochens resultierten (Bord et al.; 1999).

Eine weitere Untersuchung zeigt, dass es zu Störungen der Knochenbildung und der Knochenarchitektur kommt, wenn das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs aufgehoben ist (Mosig et al. 2007). Die Untersuchungen an Mäusen mit der den Knochen betreffenden Erkrankung MOA (multicentric osteolysis with arthritis) konnten zeigen, dass als Ursache für die sich ergebenden Fehlbildungen des Knochens eine Mutation im Gen für MMP 2 gefunden werden konnte (Mosig et al. 2007).

Dass MMPs und TIMPs an Fehlbildungen und Erkrankungen des Knochens beteiligt sind, wurde wiederholt angenommen und auch belegt. Allerdings bezogen sich die meisten Untersuchungen vorzugsweise auf deren Vorkommen in Osteoklasten und Osteoblasten. Das Vorhandensein dieser Matrix-Metalloproteinasen in den lining cells zu untersuchen, ist ein neuer Ansatz dieser Arbeit.

Mittels der immunfluoreszenzoptischen Nachweismethoden konnte das Vorkommen von MMPs und TIMPs in den lining cells und auch den anderen Knochenzellen belegt werden. Das Vorkommen, bzw. ein Nicht-Vorkommen dieser Enzyme konnte anhand der Immunfluoreszenz quantifiziert werden. Als Hilfestellung zur Identifikation der Zellen dienten die stets mit DAPI blau angefärbten Zellkerne. Hierdurch war es möglich die einzelnen Zellen zu unterscheiden, und eine Aussage zu treffen, ob ein positives oder ein negatives Ergebnis in einem bestimmten Zelltyp vorlag. Konnte man um den Zellkern grün leuchtendes Zytoplasma nachweisen, wurde das Ergebnis als positiv beurteilt; war lediglich der Zellkern zu erkennen, ohne ein grünes Signal in dessen Umgebung, wurde das Ergebnis als negativ beurteilt. In den meisten Fällen lieferten die Mehrzahl der untersuchten Zellen das selbe Ergebnis. Das heißt, in einem untersuchten Präparat waren entweder alle lining cells positiv, oder aber alle waren negativ. In den wenigsten Fällen waren hier Unterschiede innerhalb eines Schnittpräparates zu finden (Abb. 10 c). Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich nicht jeder Abschnitt der endostalen Oberfläche zu jeder beliebigen Zeit im gleichen Aktivitätsstadium befindet. Es scheint möglich, dass aktiver Umbau stattfindet in direkter Nachbarschaft zu inaktiver endostaler Knochenoberfläche.

Insgesamt betrachtet, konnten wir die von uns untersuchten MMPs und TIMPs in unterschiedlicher Häufigkeit in den lining cells nachweisen. In nahezu allen lining cells der untersuchten Knochenpräparate, konnten MMP 13, MMP 14 und TIMP 1 gezeigt werden. In 96,6 % aller untersuchten Fälle waren MMP 14 und TIMP 1 in den lining cells zu finden, während MMP 13 in 86,6 % der Proben nachweisbar war. Nahezu ebenso häufig war TIMP 2 zu finden, welches in 76,6 % der Fälle eine Immunreaktivität zeigte. Etwas weniger häufig nachzuweisen war MMP 2, welches in nur 33,3 % der untersuchten Fälle in den lining cells positiv markiert war. Eine untergeordnete Rolle scheinen TIMP 3 und TIMP 4 zu spielen, mit einem Vorkommen in 6% bzw. 23 % der lining cells in den untersuchten Fällen.

Da sich MMPs und TIMPs im gesunden Knochen die Waage halten, kommt es nicht zu Störungen der Knochenbildung oder des Knochenabbaus. Um pathologische Prozesse entstehen zu lassen, muss dieses Gleichgewicht gestört sein. In der vorliegenden Arbeit wurden Knochenproben ausgewertet, welche primär unter einer hämatologischen Fragestellung entnommen worden waren, so dass angenommen werden konnte, es sich bei hämatologischen Normalbefunden um Präparate knochengesunder Patienten handelte. Dementsprechend konnte ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass MMP 2 bei den weiblichen Probanden etwas häufiger als bei den männlichen Probanden nachweisbar war. Betrachtet man selektiv die Proben von weiblichen Patienten, waren hier die lining cells in 49,6 % positiv markiert, während bei den Männern nur 20% der untersuchten lining cells eine Immunreaktivität zeigten.

#### **7.4 Bedeutung für die Entstehung einer Osteoporose**

Es ist bekannt, dass MMPs eine Rolle beim „bone remodelling“ und in der Osteogenese spielen. Zwei Typen von Proteinasen sind hauptsächlich verantwortlich für die Resorption von Knochen. Es sind dies die Cystein-Proteinasen und die von uns untersuchten Matrix-Metalloproteinasen. Bisher wurden diese Enzyme aber vorwiegend in den „aktiven“ Knochenzellen, nämlich den Osteoklasten und den Osteoblasten nachgewiesen (Gary Dew et al.; 2000).

Die Osteoporose ist eine Erkrankung, bei der es bekanntermaßen zu einem kontinuierlichen Verlust der Knochenmasse kommt. Auch die lining cells scheinen nach unseren Untersuchungsergebnissen zu diesem Vorgang beizutragen. Denn sie verfügen, wie wir darstellen konnten, über MMPs die sie in die Lage versetzen, die Kollagene des Knochens abzubauen. Die Gegenspieler der MMPs, die TIMPs, sind ebenfalls in den lining cells nachweisbar. Kommt es nun durch regulatorische Einflüsse, zu einem Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs, wäre es denkbar, dass ein Überwiegen der MMP-Aktivität zu einem Netto-Verlust der Knochenmasse führt. Da die lining cells, wie wir nachweisen konnten, etwa 90% der endostalen Knochenoberfläche bedecken, bietet sich diesen Zellen eine erheblich größere Angriffsfläche für den Knochenabbau, als dies für die Osteoklasten der Fall ist. Es ist daher wahrscheinlich, dass die große Flächenausdehnung der lining cells in katabolen Phasen zum Knochenverlust und damit zur Entstehung der „low-turnover-Osteoporose“ beitragen kann.

Der Beleg für diese Hypothese ist durch die vorgelegten Untersuchungen in einem wichtigen Schritt erbracht. Da unsere Ergebnisse aber auf einer statischen Nachweismethode beruhen, sind funktionelle Rückschlüsse nur sehr eingeschränkt möglich. Die definitive funktionelle Bedeutung der katabolen Eigenschaften von „bone lining cells“, muss auch ihre Beteiligung an der Demineralisation der Knochenoberfläche einbeziehen, die in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt wurde. Analog zur periosteozytären Osteolyse ( Vergrößerung der Osteozytenlakunen) bei renaler Osteopathie (Belanger et al.; 1969) ist auch eine demineralisierende Eigenschaft der lining cells denkbar, die aber durch geeignete Untersuchungen belegt werden müsste.

Des Weiteren wäre auch ein funktioneller Ansatz zu finden, der den Beitrag der lining cells zum Knochenverlust im Rahmen osteoporotischer Knochenerkrankungen erfassen könnte. Die histologische Beobachtung, dass osteoporotische Spongiosa älterer Patienten durch glatte Knochenoberflächen gekennzeichnet ist, widerspricht der Auffassung eines allein durch Osteoklasten hervorgerufenen Knochenverlustes, bei dem eine durch Resorptionslakunen zerfurchte Knochenoberfläche zu erwarten wäre. Wir glauben, mit der vorliegenden Arbeit einen innovativen Beitrag zur Erklärung der Osteoporose des älteren Menschen geleistet zu haben, der in letzter Konsequenz auch zu einer Neubewertung der bisher eingesetzten therapeutischen Ansätze führen könnte.



## **8. Zusammenfassung**

Die Osteoporose ist eine Erkrankung, bei der es zu einem pathologischen Verlust der Knochenmasse kommt. Risikofaktoren sind das weibliche Geschlecht und das zunehmende Lebensalter. Besonders deutlich wird dieser Verlust an Knochenmasse an der Spongiosa. Hier kommt es zum Verlust der Vernetzung der einzelnen Trabekel untereinander und somit zu einem Verlust der Stabilität des Knochens. Dadurch treten vermehrt Frakturen ohne adäquates Trauma (pathologische Frakturen) auf, wie beispielsweise hüftnahe Frakturen, Radiusfrakturen und Sinterungsfrakturen von Wirbelkörpern.

Es werden viele Ursachen und Einflussfaktoren diskutiert, welche eine Osteoporose entstehen lassen bzw. begünstigen können. Nach bisherigem Kenntnisstand wird angenommen, dass ein übermäßiger Knochenabbau durch Osteoklasten (high-turnover-Osteoporose) bzw. ein verminderter Knochenaufbau durch Osteoblasten (low-turnover-Osteoporose), aufgrund einer gestörten An- / Abbaubilanz von entscheidender Bedeutung wäre.

Die Ursache für das Entstehen einer Osteoporose ist unserer Auffassung nach allerdings nicht alleine durch eine „Fehlfunktion“ dieser „aktiven“ Knochenzellen zu erklären.

Wir haben deshalb die, vermeintlich inaktiven, lining cells der endostalen Knochenoberfläche genauer betrachtet. Unsere Untersuchungen belegen, dass lining cells eine Ausstattung mit katabolen Enzymen besitzen, die sie in die Lage versetzen können, Knochenmatrix abzubauen. Die katabole Aktivität der lining cells wird durch die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) erzeugt. Diese können allerdings durch ebenfalls in lining cells exprimierte Inhibitoren (TIMP) gehemmt werden. Für den Netto-Effekt spielt möglicherweise eine Störung des Gleichgewichtes zwischen MMPs und TIMPs eine Rolle. Hier könnte demnach eine wichtige Ursache für die Entstehung einer Osteoporose zu finden sein, zumal die lining cells, wie wir zeigen konnten, mit etwa 90% den weitaus größten Teil der endostalen Knochenoberfläche bedecken, und sich ihnen somit wesentlich mehr Knochenoberfläche für Um-/Abbauprozesse bietet, als dies für Osteoklasten und Osteoblasten der Fall ist.

In wie weit die lining cells in der Lage sind, die Knochenoberfläche aktiv zu demineralisieren oder mineralprotektive Eigenschaften zu verlieren, muss in weiteren Schritten zur Aufklärung ihrer katabolen Funktion untersucht werden.

## **9. Summary**

Osteoporosis is a chronic bone disease with a pathological loss of bone. Elderly persons in particular women, are mostly concerned. In trabecular bone a reduction of bone mass and of trabecular crosslinking leads to a loss of stability of the affected skeletal parts (e.g. vertebral fracture). Thus an increased incidence of fractures without adequate trauma (pathological fractures) occurs.

There are some well known pathogenetic processes which may partly explain the origin of osteoporosis. Up to now it is assumed that osteoclasts and osteoblasts cause the net bone loss by an increased osteoclastic bone resorption (high-turnover-osteoporosis) or a reduced osteoblastic bone formation (low-turnover-osteoporosis). We hypothesized that the origin of osteoporosis is not exclusively based on a decoupling of these „active“ bone cells, covering only 10% of the endosteal surfaces. To a far larger extend (90%) bone lining cells cover the endosteal surfaces of the adult and aging skeleton. Under the assumption that this huge endosteal surface could be submitted to a catabolic process we studied the proteolytic capabilities of bone lining cells.

Our analysis demonstrates that bone lining cells do have catabolic properties enabling them to play an important role in bone matrix degradation. This catabolic properties are due to an enzymatic equipment with matrix-metalloproteinases (MMP). The MMPs may be blocked by tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases (TIMP), which are also expressed in lining cells. For the loss of bone mass by lining cells a disturbed balance between matrix-metalloproteinases and their inhibitors may be crucial.

To support the hypothesis it remains to be clarified whether the proteolytic (catabolic) activity of bone lining cells is accompanied by an influence on bone demineralisation as well.

## **10. Literatur**

1. Ajubi NE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ, Vrijheid-Lammers T, Alblas MJ, Burger EH(1996) Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes – A cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Comm* 225(1): 62-68
2. Aubin JE, Liu F (1996) The Osteoblast lineage. *Principles of bone biology*. Academic press. 51-67
3. Aubin JE, Lian JB, Stein GS (2006) Bone formation: Maturation and functional activities of osteoblast lineage cells. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research* 6: 20-29
4. Banerjee SS, Shanks JH, Hasleton PS (1997) VS38 immunostaining in neuroendocrine tumours. *Histopathology* 30: 256-259
5. Banham AH, Turley H, Pulford K, Gatter K, Mason DY (1997) The plasma cell associated antigen detectable by antibody VS38 is the p63 rough endoplasmatic reticulum protein. *J Clin Pathol* 50:485-489
6. Belanger LF (1969) Osteocytic osteolysis. *Calcif tissue res* 4(1): 1-12
7. Bonewald LF (2002) Osteocytes: A proposed multifunctional bone cell. *J Musculoskel Neuron Interact* 2(3): 239-241
8. Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JR, Compston JE(1997) Distribution of matrix-metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. *J Anat* 191: 39-48
9. Bord S, Horner A, Beeton CA, Hembry RM, Compston JE(1999) Tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase-1 (TIMP 1) distribution in normal and pathologic bone. *Bone* 24(3): 229-235

10. Bradbeer JN, Zanelli JM, Lindsay PC, Pearson J, Reeve J (1992) Relationship between the localization of osteoblastic alkaline phosphatase activity and bone formation in human iliac crest bone. *J Bone Miner Res* 7(8): 905-912
11. Caldwell RA (1962) Observations on the incidence, aetiology, and pathology of senile osteoporosis. *J Clin Pathol* 15: 421-431
12. Camacho P, Kleerekoper M (2006) Biochemical markers of bone turnover. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research 6: 127-132
13. Cummings SR, Kelsey JL, Nevitt MC, O'Dowd KJ (1985) Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. *Epidemiol Rev* 7: 178-208
14. Dawson-Hughes B (2006) Calcium and Vitamin D. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research 6: 257-258
15. Dempster DW (2006) Anatomy and Function of the Adult Skeleton. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research 6: 7-11
16. Dew G, Murphy G, Stanton H, Vallon R, Angel P, Reynolds JJ, Hembry RM (2000) Localization of matrix metalloproteinases and TIMP-2 in resorbing mouse bone. *Cell Tissue Res* 299: 385-394
17. Dierkes C, Kreisel M, Schulz A, Steinmeyer J, Wolff JC, Fink L (2009) Catabolic properties of microdissected human endosteal bone lining cells. *Calcif Tissue Int* 84(2): 146-155
18. Dodds RA, Emery RJH, Kleenerman L, Chayen J, Bitensky L (1989) Comparative metabolic enzymatic activity in trabecular as against cortical osteoblasts. *Bone* 10(4): 251-254

19. Dzwonek J, Rylski M, Kaczmarek L (2004) Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Letters* 567(1): 129-135
20. Eastell R (2006) Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism* by The American Society for Bone and Mineral Research 6: 259-261
21. Eisman JA (2006) Genetics of Osteoporosis. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism* by The American Society for Bone and Mineral Research 6: 249-254
22. Eisman JA (2006) Ethics in Publication. *J Bone Miner Res* 21(1): 1-3
23. Ellerbroek SM, Fishman DA, Kearns AS, Bafetti LM, Stack MS (1999) Ovarian carcinoma regulation of matrix-metalloproteinase-2 and membrane type 1 matrix-metalloproteinase through  $\beta 1$  integrin. *Cancer Res* 59: 1635-1641
24. Everts V, Aronson DC, Beertsen W (1985) Phagocytosis of bone collagen by osteoclasts in two cases of pycnodysostosis. *Calcif tissue Int* 37: 25-31
25. Everts V, Delaissé JM, Körper W, Niehof A, Vaes G, Beertsen W (1992) Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix-metalloproteinases. *J Cell Physiol* 150: 221-231
26. Everts V, Hoeben K, Beertsen W (1993) The release of tissue inhibitor of metalloproteinases by calvarial bone explants and its immunolocalization. *Bone Miner* 22(1): 43-55
27. Everts V, van der Zee E, Creemers L, Beertsen W (1996) Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodelling. *J Histochem* 28: 229-245

28. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W (2002) The bone lining cell: Its role in cleaning howship lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 17(1): 77-90
  
29. Everts V, Korper W, Hoeben KA, Jansen IDC, Bromme D, Cleutjens BJM, Heeneman S, Peters C, Reinheckel T, Saftig P, Beertsen W (2006) Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. *J Bone Miner Res* 21(9): 1399-1408
  
30. Filanti C, Dickson GR, DiMartino D, Ulivi V, Sanguineti C, Romano P, Palermo C, Manduca P (2000) The expression of MMP-2,-9,14 and of TIMP-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing MMP-14. *J Bone Miner Res* 15(11): 2154-2166
  
31. Freije JMP, Díez-Itza I, Balbín M, Sánchez L, Blasco R, Tolivia J, López-Otín C(1994) Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix-metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269(24): 16766-16773
  
32. Frost HM(1989) Some ABCs of skeletal Pathophysiology III: Bone balance and the  $\Delta B.BMU$ . *Calcif Tissue Int* 45: 131-133
  
33. Gehorn Robey P, Boskey AL(2006) Extracellular matrix and biomineralization of bone. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research* 6: 12-19
  
34. Greenspan SL, Luckey MM(2006) Evaluation of postmenopausal osteoporosis. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research* 6: 268-272

35. Guo LJ, Luo XH, Xie H, Zhou HD, Yuan LQ, Wang M, Liao EY (2006) Tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase-1 suppresses apoptosis of mouse bone marrow stromal cell line MBA-1. *Calcif Tissue Int* 78(5): 285-292
36. Hagen W, Schwarzmeier J, Walchshofer S, Zojer N, Chott A, Sillaber C, Ackermann J, Simonitsch I, Bühring HJ, Drach J, Lechner K, Horny HP, Valent P (1998) A case of bone marrow mastocytosis associated with multiple myeloma. *Ann Haematol* 76: 167-174
37. Harvey N, Earl S, Cooper C (2006) The epidemiology of osteoporotic fractures. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research* 6: 244-248
38. Hausler G, Walter I, Helmreich M, Egerbacher M (2005) Localization of matrix-metalloproteinases (MMP), their tissue inhibitors, and vascular growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeleton maturation. *Calcif Tissue Int* 76(5): 326-335
39. Haeusler B, Gothe H, Göl D, Glaeske D, Pienthal L, Felsenberg D (2007) Epidemiology, treatment and cost of osteoporosis in Germany – the BoneEVA Study. *Osteoporos Int.* 18(1):77-84
40. Heaney RP (2006) Nutrition and Osteoporosis. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research* 6: 255-256
41. Heersche JNM(1978) Mechanism of osteoclastic bone resorption: A new hypothesis. *Calcif Tissue Res* 26(1): 81-84
42. Hill PA, Murphy G, Docherty AJP, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, Meikle MC (1994) The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci* 107(11): 3055-3064



43. Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole AR (2005) The Metalloproteinases MT-MMP 1 is required for normal development and maintenance of osteocyte process in bone. *J cell Science* 118: 147-156
  
44. Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ (2000) Regulation of cell invasion and morphogenesis in an three- dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix-metalloproteinases 1,2 and 3. *J Cell Biol* 149(6): 1309-1323
  
45. Hügler S (2008) Deklaration von Helsinki: Die Ethikdebatte geht in eine neue Runde. *Dtsch Med Wochenschr.*
  
46. Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Mitsuya T ( 2005) Effusion cytodiagnosis of carcinosarcoma derived from female genital tract: immunohistochemical features of MMP-7 and Ki-67 and immunofluorescence double staining analyses of eight cases. *Gynaecol Oncol* 97: 323-329
  
47. Kagayama M, Sasano Y, Mizoguchi I, Takahashi I (1997) Confocal microscopy of cementocytes and their lacunae and canaliculi in rat molars. *Anat Embryol* 195(6): 491-496
  
48. Kalinski T, Krueger S, Pelz AF, Wieacker P, Hartig R, Röpke M, Schneider-Stock R, Dombrowski F, Roessner A (2005) Establishment and characterization of the permanent human cell line C3842 derived from a secondary chondrosarcoma in Ollier`s disease. *Virchows Arch* 446(3): 287-299
  
49. Kamioka H, Miki Y, Sumitani K, Tagami K, Terai K, Hozoi K, Kawata T (1995) Extracellular calcium causes the release of calcium from intracellular stores in chick osteocyte. *Biochem Biophys Res Comm* 212(2): 692-696

50. Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, Delaissé JM, Foged NT (2002) Matrix Metalloproteinase-dependent activation of latent growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem* 277(46):44061-7
51. Knäuper V, López-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G (1996) Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271(3): 1544-1550
52. Lerner UH (2000) Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol* 19: 107-120
53. Lindsay R, Cosman F (2006) Effect of estrogen intervention on the skeleton. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research 6: 273-276
54. Margulies IMK, Höyhty M, Evans C, Stracke ML, Liotta LA, Stettler-Stevenson WG (1992) Urinary type IV collagenase: Elevated levels are Associated with bladder transitional cell carcinoma. *Cancer Epidemiol* 1: 467-474
55. Martin TJ, Ng KW(1994) Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. *J Cell Biochem* 56(3): 357-366
56. Mbalaviele G, Shin CS, Civitelli R (2006) Cell-Cell adhesion and signaling through cadherins: Connecting bone cells in their microenvironment. *J Bone Miner Res* 21(12): 1821-1827
57. Meikle MC, Bord S, Hembry RM, Compston J, Croucher PI, Reynolds JJ (1992) Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J Cell Sci* 103: 1093-1099
58. Merz WA (1967) Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen im Knochengewebe. *Mikroskopie Bd.* 22: 132-142

59. Miller SC, Jee WSS (1987) The bone lining cell: A distinct phenotype. *Calcif Tissue Int* 41: 1-5
60. Miller PD, Leonard MB (2006) Clinical use of bone mass measurement in children and adults for the assessment and management of osteoporosis. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research* 6: 150-160
61. Miller VJ (1992) The effect of age on condylar asymmetry in patients with craniomandibular disorders of arthrogenous origin. *J Prosthet Dent* 67: 845-846
62. Miao D, Scutt A (2002) Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* 50(3): 333-340
63. Mosig RA, Dowling O, DiFeo A, Ramirez MCM, Parker IC, Abe E, Diouri J, Aqeel A, Wylie JD, Oblander SA, Madri J, Bianco P, Apte SS, Zaidi M, Doty SB, Majeska RJ, Schaffler MB, Martignetti JA (2007) Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. *Human Molecular Genetics* 15(9): 1113-1123
64. Moss DW (1982) Alkaline Phosphatase Isoenzymes. *Clin Chem* 28(10): 2007-2016
65. Nakamura H, Sato G, Hirata A, Yamamoto T (2004) Immunolocalization of matrix-metalloproteinase 13 on bone surface under osteoclasts in rat tibia. *Bone* 34(1): 48-56
66. Nelson DA, Norris SA, Gilsanz V (2006) Childhood and Adolescence. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research* 6: 55-62

67. Olsen BR (2006) Bone Embryology. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research 6: 2-6
68. Orwoll ES (2006) Osteoporosis in men. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research 6: 290-292
69. Ott SM (1996) Theoretical and Methodological Approach. Principles of bone biology. Academic press. 231-241
70. Oum`hamed Z, Garnotel R, Josset Y, Trenteseaux C, Laurent-Maquin D (2004) Matrix-metalloproteinases MMP-2,-9 and tissue inhibitors TIMP-1,-2 expression and secretion by primary human osteoblast cells in response to titanium, zirconia, and aluminium ceramics. J Biomed Mater Res A 68: 114-122
71. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. J Bone Miner Res 2(6): 595-610
72. Parisuthiman D, Mochida Y, Duarte WR, Yamauchi M (2005) Biglycan modulates osteoblast differentiation and matrix mineralization. J Bone Miner Res 20(10): 1878-1886
73. Partridge NC, Winchester SK (1996) Osteoblast Proteinases. Principles of bone biology. Academic press. 207-216
74. Pinero GJ, Farach-Carson MC, Devoll RE, Aubin JE, Brunn JC, Butler WT (1995) Bone matrix proteins in osteogenesis and remodelling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein,  $\alpha_2$ -HS-Glycoprotein and alkaline phosphatase. Arch Oral Biol 40(2): 145-155

75. Poulter LW, Chilos M, Seymour GJ, Hobbs S, Janossy G  
Immunofluorescence membrane staining and cytochemistry, applied in  
combination for analysing cell interactions in situ. *Immunocytochemistry*: 233-246
76. Qiu S, Sudhaker Rao D, Fyhrie DP, Palnitkar S, Parfitt AM (2005) The  
morphological association between microcracks and osteocyte lacunae in  
human cortical bone. *Bone* 37(1): 10-15
77. Reid IR (2006) Menopause. Primer on the metabolic bone disease and  
disorders of mineral metabolism by The American Society for Bone and Mineral  
Research 6: 68-70
78. Robey PG (1996) Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. *Principles of  
bone biology*. Academic press. 155-166
79. Robey PG, Boskey AL (2006) Extracellular Matrix and Biomineralization of  
Bone. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral  
metabolism by The American Society for Bone and Mineral Research 6: 12-19
80. Rodan GA, Raisz LG, Bilezikian JP (1996) Pathophysiology of Osteoporosis.  
*Principles of bone biology*. Academic press. 979-990
81. Roderfeld M, Hemmann S, Roeb E (2007) Mechanisms of fibrinolysis in chronic  
liver injury (with special emphasis on MMPs and TIMPs). *Z Gastroenterol* 45(1):  
25-33
82. Rosen CJ, Kiel DP (2006) Age-related Osteoporosis. Primer on the metabolic  
bone disease and disorders of mineral metabolism by The American Society for  
Bone and Mineral Research 6: 71-75
83. Ross FP (2006) Osteoclast Biology and bone resorption. Primer on the  
metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism by The American  
Society for Bone and Mineral Research 6: 30-35

84. Rubinacci A, Villa I, Dondi Benelli F, Borgo E, Ferretti M, Palumbo C, Marotti G (1998) Osteocyte-bone lining cell system at the origin of steady ionic current in damaged amphibian bone. *Calcif tissue Int* 63: 331-339
85. Rubinacci A, Covini M, Bisogni C, Villa I, Galli M, Palumbo C, Ferretti M, Muglia MA, Marotti G (2002) Bone as an ion exchange system: evidence for link between mechanotransduction and metabolic needs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(4): E851-864
86. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M (2005) Up-regulation of the lymphatic marker Podoplanin, a mucin-type transmembran glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell carcinomas. *Am J Pathol* 166(3): 913-921
87. Schupp DJ, Huck BP, Sykora J, Flechtenmacher C, Gorenflo M, Koch A, Sack FU, Haass M, Katus HA, Ulmer HE, Hagl S, Otto HF, Schnabel PA (2006) Right ventricular expression of extracellular matrix proteins, matrix-metalloproteinases, and their inhibitors over a period of 3 years after heart transplantation. *Virchows Arch* 448(2): 184-194
88. Schweizer A, Ericsson M, Bächli T, Griffiths G, Hauri HP (1993) Characterization of a novel 63 kDa membrane protein. Implications for the organization of the ER-to-Golgi pathway. *J Cell Sci* 104: 671-683
89. Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar A (2004) Distribution patterns of matrix-metalloproteinases (MMP) -2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta Histochem* 106(5): 353-362
90. Shanks JH, Banerjee SS (1996) VS38 immunostaining in melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 49:205-207

91. Sobue T, Hakeda Y, Kobayashi Y, Hayakawa H, Yamashita K, Aoki T, Kumegawa M, Noguchi T, Hayakawa T (2001) Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 directly stimulate the bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* 16(12):2205-2214
92. Sonne SB, Herlihy AS, Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Marks A, Leffers H, Rajpert-DeMeyts E (2006) Identity of M2A (D2-40) antigen and gp36 (Aggrus, T1A-2, podoplanin) in human developing testis, testicular carcinoma in situ and germ-cell tumours. *Virchows Arch* 449(2): 200-206
93. Sulzbacher I, Fuchs M, Chott A, Lang S (1997) Expression of VS38 in osteoblasts and stroma cells of bone tumors. *Pathol Res Pract* 193: 613-616
94. Tran Van P, Vignery A, Baron R (1982) An electron microscopic study of the bone-remodelling sequence in the rat. *Cell Tissue Res* 225(3): 283-292
95. Turley H, Jones M, Erber W, Mayne K, deWaele M, Gatter K (1994) VS38: a new monoclonal antibody for detecting plasma cell differentiation in routine sections. *J Clin Pathol* 47: 418-422
96. Turner CH, Robling AG, Duncan RL, Burr DB (2002) Do bone cells behave like a neuronal network? *Calcif Tissue Int* 70:435-442
97. Uekita T, Yamanouchi KM, Sato H, Tojo H, Seiki M, Tachi C (2004) Expression and localization of matrix-metalloprotenases (MT-MMP, MMP 2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) during synepitheliochorial placentation of goats. *Placenta* 25(10): 810-819
98. Uría JA, Balbín M, López JM, Alvarez J, Vizoso F, Takigawa M, López-Otín C (1998) Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol* 153: 91-101

99. von Randow AJ, Schindler S, Tews DS (2006) Expression of extracellular matrix-degrading proteins in classic, atypical and anaplastic meningiomas. *Pathol Res Pract* 202(5): 365-372
100. Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC (2000) Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 85(8): 2907-2912
101. Woodward JKL, Holen I, Coleman RE, Buttle DJ (2007) The role of proteolytic enzymes in development of tumor-induced bone disease in breast and prostate cancer. *Bone* 41(6): 912-927



## **11. Anhang**

### **11. 1 Abkürzungsverzeichnis**

AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase Verfahren
BAr	Bone Area
BMD	Bone mineral density
BMU	Basic multicellular unit
BPm	Bone Perimeter
BSA	Bovines Serumalbumin
DAPI	der Fluoreszenzfarbstoff 4',6 Diamidino-2-phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat bzw. Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisoithiocyanat
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MT-MMP	membran-type matrix-metalloproteinase; = membranständige MMP
NCP	nicht-collagene Proteine des Knochens
OB	Osteoblasten
ObPm	Osteoblast-Perimeter
OC	Osteoclasten
OcPm	Osteoclast-Perimeter
PBS	phosphate buffered saline; = Phosphat-gepufferte Salzlösung
QCT	quantitative Computertomographie
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand; ein Tumornekrosefaktor
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation; =Standardabweichung
TAr	Tissue Area
TBS	Tris buffered saline
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## **11.2 Materialliste**

APAAP	Fa. DAKO
BSA	Fa. Merck
CD 68 (clone PG-M1)	Fa. DAKO
Collagen I	Fa. Chemicon
Collagen II	Fa. Chemicon
Collagen III	Fa. Chemicon
DAPI	Fa. Serva
Decorin (LF4)	nicht kommerziell erhältlicher Primärantikörper Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Larry Fisher
FITC	Fa. Dianova
Keratin-AK	Fa. Dianova
MMP-AK	Fa. Chemicon
Objektträger	Fa. DAKO
Osteocalcin	nicht kommerzielle erhältlicher Primärantikörper
Osteopontin (LF7)	nicht kommerziell erhältlicher Primärantikörper Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Larry Fisher
Soper-Frost-Objektträger	Fa. R. Langenbrink
TIMP-AK	Fa. Chemicon
Triton X <sub>100</sub>	Fa. Merck
Vectashield antifade	Fa. Vector
Vimentin (V9)	Fa. DAKO
VS38c	Fa. DAKO

### **11.3 Eigene Publikationen**

#### **Posterpräsentationen**

**Kreisel M.**, Dierkes C., Schulz A. Immunfluoreszenznachweis kataboler Eigenschaften der endostalen Knochenoberflächenzellen. Osteologie 2008, Hannover 02.-05. April 2008.

**Kreisel M.**, Dierkes C., Schulz A. Immunfluoreszenznachweis kataboler Eigenschaften der endostalen Knochenoberflächenzellen. 92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin 15.-18. Mai 2008.

Dierkes C. **Kreisel M.**, Schulz A., Wolff J.-C., Fink L. Expression of MMPs and TIMPs in human bone lining cells indicating a possible catabolic function in bone remodelling? 92. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Pathologie, Berlin 15.-18. Mai 2008. Veröffentlicht in Der Pathologe Bd. 29, Suppl. 1:46.

Dierkes C., **Kreisel M.**, Wolff J., Fink L., Schuz A. Catabolic function of endosteal bone lining cells analyzed by laser-assisted Microdissection and RT-PCR. 35<sup>th</sup> European Symposium on Calcified Tissue, 24.-28. Mai 2008, Barcelona. Veröffentlicht in Calcif. Tiss. Int. 82 (Suppl. 1): S 101.

#### **Publikationen**

Dierkes C, **Kreisel M**, Schulz A, Steinmeyer J, Wolff JC, Fink L (2009) Catabolic properties of microdissected human endosteal bone lining cells. Calcif Tissue Int 84(2): 146-155.

#### **11.4 Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 06.07.2009

Melanie Kreisel

### **11.5 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Schulz für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit im Institut für Pathologie durchführen zu können.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. C. Dierkes für die Unterstützung und Hilfestellung während dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich:

Frau Marion Ross für die Unterstützung bei meiner Arbeit mit den Zellkulturen und im weiteren Verlauf auch bei der Arbeit mit der Immunfluoreszenzmethode.

Herrn Frank Dönges für die Unterstützung bei der speziellen Behandlung der Knochenschnitte für die Immunfluoreszenz.

Frau Dr. U. Gammerdinger für die Hilfestellung beim Umgang mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Herrn Sven-Marc Burchert und Frau Gudrun Jurat für die Hilfestellung bei der Darstellung der Fotografien in dieser Arbeit.

Meinen Eltern, meinem Bruder und seiner Familie und meinen Freunden für das Verständnis und die Unterstützung während dieser Arbeit.